

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Gerd Sutter

**Untersuchung der Expression von Proteinen
des Staupevirus durch das
Modifizierte Vacciniavirus Ankara
im Hinblick auf
die Erstellung von Vakzineandidaten**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Marcus Volker Müller
aus Karlsruhe

München 2014

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Tag der Promotion: 12. Juli 2014

Meiner kleinen Mama

French: Maladie des Chiens. Maladie du jeune age.

German: Hundestaube. Hundekrankheit.

Spanish: Reuma.

Italian : Cimurro.

DEFINITION

Canine Distemper is a specific, malignant, contagious and infectious catarrhal fever, affecting all mucous membranes, but primarily those of the respiratory tract.

It is chiefly, but not essentially, a disease of young animals of the canine and feline race, appearing sporadically, enzootically, or epizootically, and frequently fraught with very serious complications and sequelae.

Hamilton Kirk, 1922

A great deal could be written about immunization against canine distemper, and much has been said in the past.

With our present knowledge and testing procedures, there is less need for words because the approach to successful protection is relatively straightforward and simple.

McClelland and Gillespie, 1966

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG	6
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	7
1	Entdeckung des infektiösen Agens.....	7
2	Taxonomie und Aufbau des Virus	8
3	Genom und ausgewählte Proteine des Staupevirus.....	9
3.1	Hämagglutinin-Protein.....	10
3.2	Fusions-Protein.....	13
3.3	Matrix-Gen	15
4	Infektionsweg und Klinik der Krankheit.....	17
5	Epidemiologie	20
6	Therapie und Prophylaxe.....	25
6.1	Therapie.....	25
6.2	Immunprophylaxe.....	26
6.3	<i>Modified Vaccinia Virus Ankara</i> (MVA) als Plattform einer Vektorvakzine.....	31
7	Zielsetzung dieser Arbeit.....	34
III.	MATERIAL UND METHODEN	36
1	<i>Alignment</i>	38
2	Sequenzkontrolle	39
3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
4	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegel-Elektrophorese.....	40
5	DNA-Extraktion aus dem Agarose-Gel	41
6	Transformation kompetenter Bakterien.....	41
7	Kultivierung von kompetenten Bakterien	42
8	Nukleinsäure-Präparation.....	43
9	Qualitätskontrolle isolierter DNA	43
10	Restriktionsverdau.....	44
11	Dephosphorylierung von DNA	45

12	Ligationsansatz.....	45
13	Gewinnung und Kultivierung primärer Zellen.....	46
14	Kultivierung und Passagierung von Zellkulturen.....	46
15	Infektion von Zellen mit MVA-Viren.....	47
16	Infektion von Zellen mit Staupe-Viren	47
17	Generierung rekombinanter MVA-Viren.....	48
18	Isolierung rekombinanter Virus-Klone (<i>plaque picking</i>).....	49
19	Herstellung eines Virusstocks	52
20	Titerbestimmung einer MVA-Virus-Suspension	53
21	Herstellung von Proteinextrakten aus kultivierten Zellen.....	54
22	Western Blot.....	55
22.1	Herstellung von diskontinuierlichen SDS-PAGE-Gelen	55
22.2	Membrantransfer	56
22.3	Immunodetektion von Proteinen	56
23	<i>Contig-Assembly</i>	58
24	Untersuchung der Replikationscharakteristika.....	59
IV.	ERGEBNISSE	60
	Generierung des Vektorplasmids	60
	Generierung und klonale Isolierung rekombinanter Viren	67
	Charakterisierung der rekombinanten Proteine nach Zellkulturinfektion.....	71
	Nachweis der genetischen Stabilität der rekombinanten Viren.....	74
	Wachstumsverhalten der rekombinanten Viren	76
V.	DISKUSSION	78
	Wahl der Antigene	78
	Wahl der Promotoren	80
	Erreichte Meilensteine	81

Weitergehende Arbeiten	84
VI. ZUSAMMENFASSUNG	86
VII. SUMMARY.....	87
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	88
IX. ANHANG TABELLEN UND SEQUENZEN	123
X. DANKSAGUNG	132

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	<i>AminoAcids</i> (Aminosäuren)
AG	Antigen
AK	Antikörper
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
°C	Grad Celsius
CDV	Canines Distemper Virus (Staupevirus)
CEF	<i>chicken embryo fibroblasts</i> (Hühnerfibroblastenzellen)
Da	Dalton
DNA	<i>desoxyribonucleic-acid</i> (DNS)
F-Gen	Fusions-Gen
G1L	essentielles MVA-Gen
G418	Geneticin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
H-Gen	Hämagglutinin-Gen
hpi	<i>hours post infection</i>
HR	homologe Rekombination
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
I8R	essentielles MVA-Gen
IL	Interleukin
IU	hier: <i>infectious units</i>
kb	Kilobase
mA	Milliampere
MDCK	Madin Darby canine kidney cells
MeV	measles virus (Masernvirus)
mg	Milligramm
M-Gen	Matrix-Gen
ml	Milliliter
MOI	multiplicity of infection
MVA	<i>Modified Vaccinia Virus Ankara</i>
µm	Mikrometer

NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
O/N	<i>over night</i> (über nacht)
pbE	plaque-bildende Einheiten (s. pfu)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pdv	Phocines Distemper Virus (Seehundstaupe)
PE3L	early Promotor von MVA
pfu	plaque forming units (s. PbE)
pH-Wert	<i>potentia Hydrogenii</i> oder <i>pondus Hydrogenii</i> ; der negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
p.i.	<i>post infectionem</i>
PmH5	early-late Promotor von MVA
PVRL4	<i>poliovirus receptor-related 4</i> ; auch Nectin-4
RNA	<i>ribonucleic-acid</i> (RNS)
RT	Raumtemperatur
S15	Staupe-Feldisolat
SLAM	<i>Signaling Lymphocytic Activation Molecule</i> ; auch: CD150
T25	Zellkulturflasche mit der Grundfläche 25cm ²
T75	Zellkulturflasche mit der Grundfläche 75cm ²
T175	Zellkulturflasche mit der Grundfläche 175cm ²
T _m	<i>melting temperature</i> (Schmelztemperatur)
U/Min.	Umdrehungen pro Minute
VeroDST	korrekt: Vero.DogSLAMtag-Zellen; den SLAM-Rezeptor von Hunden exprimierende grüne Meerkatzen-Nierenzelllinie
WB	Western Blot
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
WT	Wildtypvirus; falls nicht anders benannt, so handelt es sich um nicht rekombinantes MVA
ZpE	zytopathischer Effekt

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Familie der <i>Paramyxoviridae</i> mit wichtigen Vertretern (modifiziert nach Chang et al., 2012 und Goodbourn et al., 2009)	8
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Paramyxovirus (Viral Zone, 2013)	8
Abbildung 3: Schema Genomorganisation	9
Abbildung 4: Phylogenetischer Stammbaum kompletter H-Gene verschiedener Staupestämme.....	12
Abbildung 5: enzymatische Spaltung von Paramyxovirus F-Protein (modifiziert nach Dutch et al., 2010)..	13
Abbildung 6: Schematischer Vorgang der Fusion bei Paramyxoviren (Chang et al., 2012).....	14
Abbildung 7: Matrix-Protein-Dimere und ihre Ladungsverteilung (Battisti et al., 2012).	16
Abbildung 8: parakristalline Struktur, der sich aggregierenden M-Homodimere (Battisti et al., 2012).	16
Abbildung 9: Phylogenetischer Stammbaum aufgrund der Genome verwandter Morbilliviren	25
Abbildung 10: Schema Generierung rekombinanter MVA-Viren durch homologe Rekombination	49
Abbildung 11: Mischinfektion Rekombinante (rot) mit ihrem Wildtyp GFP-MVA (grün)	50
Abbildung 12: Schema der Aufreinigung rekombinanter MVAs über <i>plaque picking</i>	51
Abbildung 13: gefärbte Plaques auf DF-1-Zellen	54
Abbildung 14: <i>Contig-Assembly</i> am Beispiel des Hämagglutinins von S15 unter Verwendung von sechs Sequenzen.....	58
Abbildung 15: Restriktionsanalyse (<i>AscI</i> x <i>PmeI</i>) des Plasmids cdvM-geneCON_ pMA-T	60
Abbildung 16: Restriktionsanalyse (<i>HindIII</i>) des MVA-Vektorplasmid pLW-73_cdvM.....	61
Abbildung 17: Architektur der Oligonukleotide zur Schnittstelleninsertion bei cdvF.	62
Abbildung 18: Architektur der Oligonukleotide zur Schnittstelleninsertion bei cdvH.....	63
Abbildung 19: MVA-Vektorplasmid pLW-73, schematisch.	65
Abbildung 20: MVA-Vektorplasmid pLW-73_cdvM, schematisch.	65
Abbildung 21: MVA-Vektorplasmid pMKIII H5 red cherry, schematisch.	66
Abbildung 22: MVA-Vektorplasmid pMKIII H5 red cherry-cdvF, schematisch.	66
Abbildung 23: MVA-Vektorplasmid pMKIII H5 red cherry-cdvFH, schematisch.	66
Abbildung 24: Kontrolle des rekombinanten MVA-cdvM mittels PCR.	67
Abbildung 25: DF1-Zellen infiziert mit GFP-MVA und mit rekombinantem MVA-cdvF.	68
Abbildung 26: Kontrolle des rekombinanten MVA-cdvF (F) mittels PCR.	69
Abbildung 27: Kontrolle der Insertionen des rekombinanten MVA-cdvFH mittels PCR.	69
Abbildung 28: PCR-Kontrolle des rekombinanten MVA-cdvFH auf Freiheit von Wildtyp-Virus.....	70
Abbildung 29: Western Blot Analyse von MVA-cdvM infizierten DF-1- (A.) und VeroDST-Zellen (B.).	71
Abbildung 30: Western Blot Analyse von MVA-cdvF infizierten DF-1- (A.) und VeroDST-Zellen (B.).	72
Abbildung 31: Prozessierung des CDV-Fusionsproteins (modifiziert nach Dutch et al., 2010).....	73
Abbildung 32: Western Blot Analyse von MVA-cdvFH infizierten DF-1Zellen.	73
Abbildung 33: Überprüfung der genetischen Stabilität des MVA-cdvM mittels PCR.	74
Abbildung 34: Überprüfung der Stabilität der Proteinexpression mittels Western Blot von MVA-cdvM infizierten DF1-Zellen.....	75

Abbildung 35: Überprüfung der genetischen Stabilität des MVA-cdvF mittels PCR.....	75
Abbildung 36: Überprüfung der Stabilität der Proteinexpression mittels Western Blot von MVA-cdvF infizierten DF1-Zellen.....	76
Abbildung 37: Multiple-step-Wachstumskurve des rekombinanten MVA-cdvM (MOI 0,1).....	77
Abbildung 38: Multiple-step-Wachstumskurve des rekombinanten MVA-cdvF (MOI 0,1).	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: klinische Manifestationsformen	19
Tabelle 2: natürliche Infektionen in der Literatur	21
Tabelle 3: Impfkomplicationen bei exotischen, empfänglichen Spezies	29
Tabelle 4: zugelassene Impfstoffe in Deutschland (Stand: März 2014)	30
Tabelle 5: Polymerasen	39
Tabelle 6: Schema Mastermixe.....	40
Tabelle 7: Plasmide, deren Spezifikationen und Herkunft.....	42
Tabelle 8: Restriktionsendonukleasen.....	44
Tabelle 9: Zellen	46
Tabelle 10: Viren.....	48
Tabelle 11: Mengenangaben für 2 oder 4 SDS-PAGE-Gele getrennt nach Gelverwendung	55
Tabelle 12: Antikörper	57
Tabelle 13: rekombinante MVA-Viren.....	81
Tabelle 14: Zusammenfassung der erwarteten Charakteristika der rekombinanten Gene bzw. Proteine und den in dieser Arbeit beobachteten.	82
Tabelle 15: Für die Bildung von <i>virus like particles</i> benötigte virale Proteine von Paramyxoviren	85
Tabelle 16: Material aus eigener Herstellung	123
Tabelle 17: erworbenes Material	124
Tabelle 18: Primer, ihre Sequenz, Schmelztemperatur und Verwendung	126
Tabelle 19: Geräte	127
Tabelle 20: verwendete Software.....	127

I. EINLEITUNG

Die Staupe ist eine seit Langem bekannte und weltweit vorkommende Erkrankung. Neben den Hunden ist eine Vielzahl anderer Raubtiergattungen empfänglich für diese, oftmals tödliche endende, virale Infektionskrankheit. Da eine kausale Therapie nicht möglich ist, stellt die aktive Immunisierung die wichtigste Maßnahme zum Schutz empfänglicher Tiere dar.

Zugelassene Impfstoffe sind jedoch in Deutschland nur für den Hund und das Frettchen verfügbar. Bei der Impfung anderer Spezies mit diesen attenuierten Lebendimpfstoffen werden regelmäßig schwerwiegende Komplikationen beobachtet, inaktivierte Vakzinen zeigen in der Regel keine ausreichende Schutzwirkung. Dies stellt insbesondere zoologische Einrichtungen und andere Halter exotischer Raubtiere vor Probleme.

Das *Modified Vaccina Virus Ankara* (MVA), ein hoch attenuierter Stamm des Vacciniavirus, welches durch Passagierung auf Hühnerzellen selektiert wurde, ist ein Vektorvirus, das als Experimentalvakzine gegen verschiedenste Infektionserkrankungen und Krebs eingesetzt wird. Wichtigste Merkmale dieses Vektorsystems sind sein hohes Sicherheitsprofil, seine genetische Stabilität, die Möglichkeit große Mengen heterologer DNA zu inserieren und die Expression fremder Proteine zu induzieren und seine Eigenschaft, sowohl eine gute humorale als auch zelluläre Immunität zu stimulieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden rekombinante MVA generiert, die zur Expression des Hämagglutinin-, Fusions- und Matrix-Proteins des Staupevirus in infizierten Zellen führte. Die genetische Stabilität der rekombinanten Vektorviren, ihr Wachstumsverhalten sowie die Expression der verschiedenen Antigene wurde untersucht und charakterisiert, um geeignete Kandidaten für eine MVA-Staupe-Vakzine zu finden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1 Entdeckung des infektiösen Agens

Beim Versuch, die Herkunft der Staupe über alte Quellen zu ermitteln, stößt man unweigerlich auf die Reiseberichte von Don Antonio de Ulloa aus den Jahren 1735-1748. Andere Quellen aus oder sogar vor dieser Zeit sind vage und könnten Tollwut als auch Staupe beschreiben (Fleming, 1871). Diese erste Beschreibung einer Infektionskrankheit in Peru mit Staupe-typischen Symptomen ist jedoch sehr genau und nennt auch den vorrangigen Wirt: südamerikanische Füchse (Blancou, 2004; De Ulloa, 1748). Spätere Quellen sprechen von Staupe-Ausbrüchen in Madrid (1763) und dann im weiteren Verlauf der 1760er Jahre in anderen Regionen Europas (Fleming, 1871). Dass Staupe aus Südamerika stammt, ist sehr wahrscheinlich.

1809 befasst sich Edward Jenner genauer mit dem Krankheitsbild. Er erkannte den infektiösen Charakter der Staupe und beschreibt, dass das „Miasma“ seine ansteckenden Eigenschaften auch nach der Trennung von kranken Hunden für eine lange Zeit behält (Jenner, 1809). Die tatsächliche Virusätiologie der Staupe wird von Henry Carré im Jahre 1905 in seiner Veröffentlichung: „*Sur la maladie des jeunes chiens*“ vorgestellt (Carré, 1905).

Nach seiner Theorie wird Staupe primär durch ein filtrierbares Virus ausgelöst, das Gesamtbild der klinischen Erkrankung aber durch bakterielle Sekundärinfektionen verursacht. Seine Experimente zeigen bereits damals, dass der seröse Nasenausfluss bei Auftreten der Erkrankung hochinfektiös ist. Diese Eigenschaft behält der Ausfluss auch nach Passage durch ein bakteriendichtes Filter. Joseph Lignières kann 1906 die Übertragbarkeit der Staupe mittels des Filtrates bestätigen (Lignières, 1906).

Damit ist jedoch der wissenschaftliche Diskurs über den Erreger der Staupe nicht beendet. Wissenschaftler wie M'Gowan (1911), Ferry (1912) oder Torrey und Rahe (1913) sind weiter davon überzeugt, dass *Bordetella bronchiseptica* das primäre ätiologische Agens sei. Erst die Studien von G. W. Dunkin und Sir Patrick Laidlaw (1928) bestätigen erneut die Ergebnisse Carré's und markieren den Übergang zur modernen Virologie. Während ihrer Arbeiten nutzen sie erstmals spezifisch Staupe-freie Tiere, sie erkennen die Möglichkeiten von Frettchen als Versuchstier, führen ihre Versuche in Isolationseinheiten durch und produzieren Seren zur Prophylaxe beim Hund, sowie eine Vakzine (Appel und Gillespie, 1972).

2 Taxonomie und Aufbau des Virus

Taxonomisch wird das Staupevirus (*Canine distemper virus*, CDV) in das Genus *Morbillivirus*, Familie *Paramyxoviridae* innerhalb der Ordnung *Mononegavirales* eingegliedert (Abbildung 1 zeigt die Taxonomie mit tiermedizinisch interessanten Vertretern).

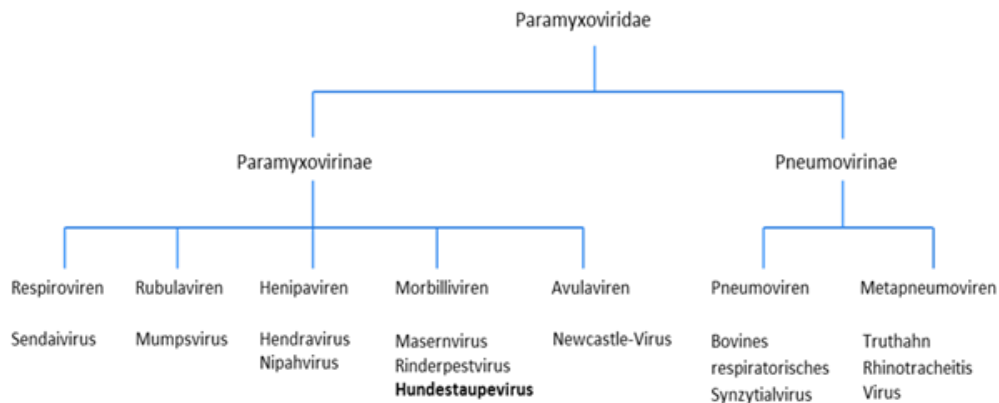


Abbildung 1: Die Familie der *Paramyxoviridae* mit wichtigen Vertretern (modifiziert nach Chang et al., 2012 und Goodbourn et al., 2009)

Das Virus zeigt dieselbe charakteristische Morphologie (siehe Abbildung 2) wie alle Paramyxoviren: es handelt sich um sphärisch-pleomorphe bis filamentöse Partikel, mit einem Durchmesser von 150-250nm.

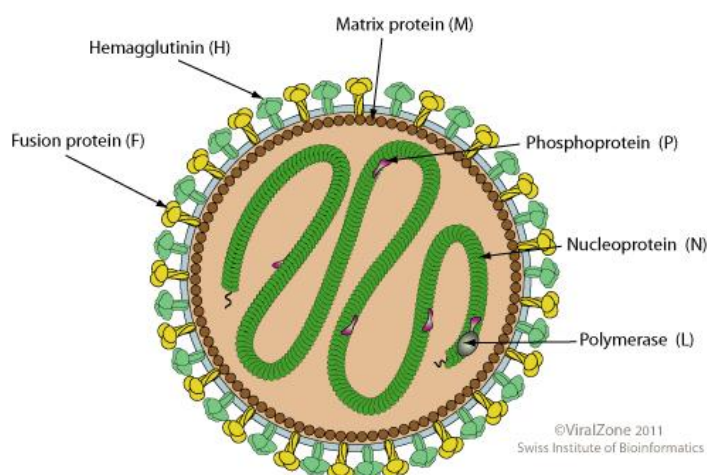


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Paramyxovirus (Viral Zone, 2013)

Die viralen Proteinbestandteile der Lipidhülle sind das M(atrix)-, das H(ämagglutinin)- und das F(usions)-Protein. Die beiden integralen Proteine H und F sind entscheidend für Anlagerung an und die Fusion mit den Wirtszellen, während das Matrixprotein die Integrität der Hülle und deren Verbindung mit dem Nukleokapsid bedingt (Harrison et al., 2010). Das helikale Nukleokapsid wird durch einzelsträngige RNA, das Nukleokapsidprotein (N) und weitere damit assoziierte Proteine (P-Protein, L-Protein= RNA-abhängige RNA-Polymerase) gebildet (Lamb et al., 2007).

3 Genom und ausgewählte Proteine des Staupevirus

Das Genom des CDV ist ca. 15,7kb lang, besitzt am 3'-Ende eine kurze als Leader bezeichnete Sequenz und am 5'-Ende einen nicht-transkribierten Bereich, der Trailer genannt wird. Die open reading frames (ORF) für die einzelnen Gene werden durch kurze, intergenische Nukleotide voneinander getrennt. Die konservierte Abfolge der ORFs im einzelsträngigen, negativ polaren, nicht-segmentierten RNA-Genom des CDV ist in Abbildung 3 gezeigt. Sie entsprechen dem Nukleokapsid-Gen (N), dem Phosphoprotein-Gen (P), dem M(atrix)-, dem F(usions)-, dem H(ämagglutinin)- und dem L(arge Protein)-Gen. Der Bereich des P-Gens kodiert außerdem für die Gene C und V, die durch ein alternatives Leseraster bzw. durch einen Editingprozess nach teilweisem Ablesen gebildet werden. Ein deutlicher Transkriptionsgradient vom 3'- zum 5'-Ende hin beruht auf dem Absetzen der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase an intergenetischen Sequenzen zwischen den einzelnen ORFs und dem Wiederansetzen am 3'-Ende, dem sogenannten Stopp-Start-Modell der Transkription (Lamb et al., 2007).

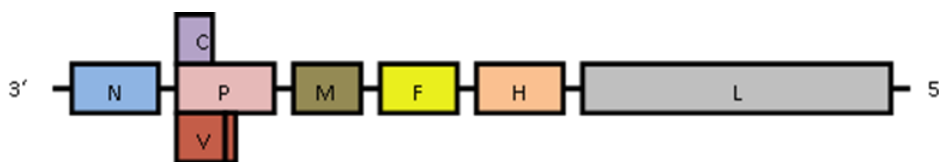


Abbildung 3: Schema Genomorganisation

Im Folgenden werden die drei, in dieser Arbeit für die Herstellung von MVA-basierten Vektorvakzinen ausgewählten, viralen Antigene eingehender beschrieben.

3.1 Hämagglutinin-Protein

Das H-Gen besitzt eine Länge von 1824bp. Das daraus resultierende integrale Typ-II-Membranprotein (Lamb et al., 2007) ist damit 607AA lang (Bolt et al., 1997; Iwatsuki et al., 1997). Der attenuierte Staupe Stamm Onderstepoort besitzt jedoch nur eine Länge von 604AA (Curran et al., 1991).

Im Gegensatz zu anderen Paramyxoviren zeigt das Hämagglutinin-Protein (H-Protein) der Morbilliviren keine Neuraminidase-Aktivität (Hashiguchi et al., 2007; Langedijk et al., 1997) und selbst die hämagglutinierenden Eigenschaften sind beim CDV fast nicht nachweisbar (Cherpillod et al., 1999; Appel und Gillespie, 1972).

Das translatierte H-Protein wird im endoplasmatischen Retikulum glykolisiert und bildet bereits dort mit dem F-Protein den Fusionskomplex (Plempner et al., 2001). Die beiden Glykoproteine bilden die Fusionsmaschinerie, bestehend aus dem Homotetramer des Hämagglutinins und dem Homotrimer des Fusionsproteins (Brindley et al., 2012; Ader et al., 2012; Plemper et al., 2011).

Das fertige Homotetramer des Hämagglutinins ist so gefaltet, dass sich ein Kopf und ein Stiel ausbilden. Die dreidimensionale Form des Kopfes erinnert damit an ein vierblättriges Kleeblatt (Hashiguchi et al., 2007). Im Bereich des Stieles wurden Bereiche für die Interaktion bzw. das Triggern des Fusionsmechanismus des F-Proteins ausgemacht (Plempner et al., 2011).

Die Funktionen des H-Proteins sind die Adsorption des Viruspartikels an bestimmte Rezeptoren auf der Zellmembran, wodurch die Distanz zwischen Virion und Plasmamembran der Zielzelle entscheidend verringert wird und die Aktivierung des Fusionsproteins. Bei der Bindung des Rezeptors werden eine Änderung in der Stellung des Kopfes und eine Änderung in der Faltung der Stielbereiche verursacht. Die vier Anteile des Stieles des homotetrameren H-Proteins sind damit nicht mehr eng um einander gewunden, sondern fasn auf und lösen so die Dissoziation vom Fusionskomplex und damit die Fusion aus (Ader et al., 2012; Brindley et al., 2012; Chang et al., 2012; Plemper et al., 2011). Der Zell- als auch der Wirtstropismus wird damit vom Hämagglutinin und seinen Eigenschaften als Ligand bestimmt (Messling et al., 2004; Messling et al., 2001). Für das CDV sind derzeit zwei zelluläre Rezeptoren bekannt, die für das *Attachment* genutzt werden.

CD150/SLAM (*signalling lymphocyte activation molecule*) wurde als der vorrangige Rezeptor für Morbilliviren erkannt (Sato et al., 2013; Yanagi et al., 2006; Tatsuo et al., 2001). Bei verschiedenen Spezies konnte gezeigt werden, dass der CD150 stark konserviert ist (Nikolin et

al., 2012; Sarkar et al., 2009; Tatsuo et al., 2001). Die typische Staupevirusinfektion erfolgt im Bereich der Schleimhäute des oberen Respirationstrakts und/oder des oberen Gastrointestinaltrakts. Dabei werden lokal, bei der ersten Vermehrung, und im Rahmen der Virämie aktivierte B- und T-Leukozyten, (Alveolar-) Makrophagen und dendritische Zellen infiziert, die alle den SLAM-Rezeptor tragen (Sato et al., 2012; Lemon et al., 2011; de Swart et al., 2011; de Vries et al., 2010; Ferreira et al., 2010; Yanagi et al., 2006; Messling et al., 2005).

Ein weiterer vom CDV genutzter Rezeptor ist Nectin-4/PVRL-4 (*poliovirus receptor-related 4*), welcher bislang als Tumormarker bei Ovar-, Brust- und Lungentumoren bekannt war (Pavlova et al., 2013; Mühlebach et al., 2011). Aufgrund der infektiösen Eigenschaften von Masern- und Staupeviren war lange von einem epithelständigen weiteren Rezeptor (EpR) dieser Morbilliviren ausgegangen worden (Sawatsky et al., 2012; Yanagi et al., 2006; Messling et al., 2004). Nectin-4/PVRL-4 ist auf verschiedenen Epithelien zu finden (Haut, Trachea, Lunge) und vermag somit den Tropismus des Virus für epitheliale Strukturen, die im weiteren Pathogenese-Geschehen der Staupe eine Rolle spielen, zu erklären (Pratakipiriya et al., 2012; Sato et al., 2012; Noyce et al., 2011; Mühlebach et al., 2011).

Die genetische Drift bei diesem Gen wird durch das Zusammenspiel zweier gegensätzlicher evolutorischer Kräfte geprägt. Zum einen besteht die Notwendigkeit der Aufrechterhaltung der Funktionalität der Rezeptorflächen und der nicht minder wichtigen Funktion des Proteins im Zusammenspiel mit dem Fusionprotein. Zum anderen unterliegt das Gen jedoch auch dem Änderungsdruck im Zuge der Immunevasion. Im Rahmen dieser genetischen Anpassung wird auch die Möglichkeit geschaffen den Ausbreitungsweg im Wirt über geringfügige Modifikationen zu steuern (Zipperle et al., 2010; Plemper et al., 2002; Messling et al., 2001; Langedijk et al., 1997; Stern et al., 1995) bzw. sogar neue Zell- und Wirtstropismen zu entwickeln (Bieringer et al., 2013; Sakai et al., 2013; Nikolin et al., 2011; Nielsen et al., 2008).

Im Spannungsfeld zwischen Anpassung und Weiterentwicklung dieser, für das Virus äußerst wichtigen Funktion des *Attachments*, kann auch die Nutzung weiterer Rezeptoren möglich werden. Dies wird darin deutlich, dass es außer den beiden bereits gut charakterisierten Rezeptoren auch mindestens einen wenig effizienten Rezeptor (CD46/MCP oder membrane cofactor protein) bei Morbilliviren gibt (Sato et al., 2012; Noyce et al., 2012; Takeda et al., 2011; Hashiguchi et al., 2007; Fujita et al., 2006; Yanagi et al., 2006; Suter et al., 2005), dessen Bindungsstelle sich am Hämagglutinin mit dem des SLAM-Rezeptors überlagert (Masse et al., 2004), bzw. mit der des Nectin-4 interagiert (Mateo et al., 2013). Solche weniger spezifischen Rezeptor-Liganden-Bindungen könnten für die weiterhin nicht schlüssig geklärte Möglichkeit

der Invasion des Nervensystems durch das Virus verantwortlich sein (Abdullah et al., 2012; Mateo et al., 2013; Sato et al., 2012; Wyss-Fluehmann et al., 2010; Bonami et al., 2007; Rudd et al., 2006).

Mittlerweile werden neun genetische Linien des Staupevirus aufgrund der Sequenzanalyse des H-Genes unterschieden (Bae et al., 2013; Panzera et al., 2012; Woma et al., 2012; Sekulin et al., 2011; Kapil et al., 2008; Martella et al., 2007; McCarthy et al., 2007; Mochizuki et al., 1999; Bolt et al., 1997), wie im folgenden phylogenetischen Stammbaum (Abbildung 4) dargestellt.

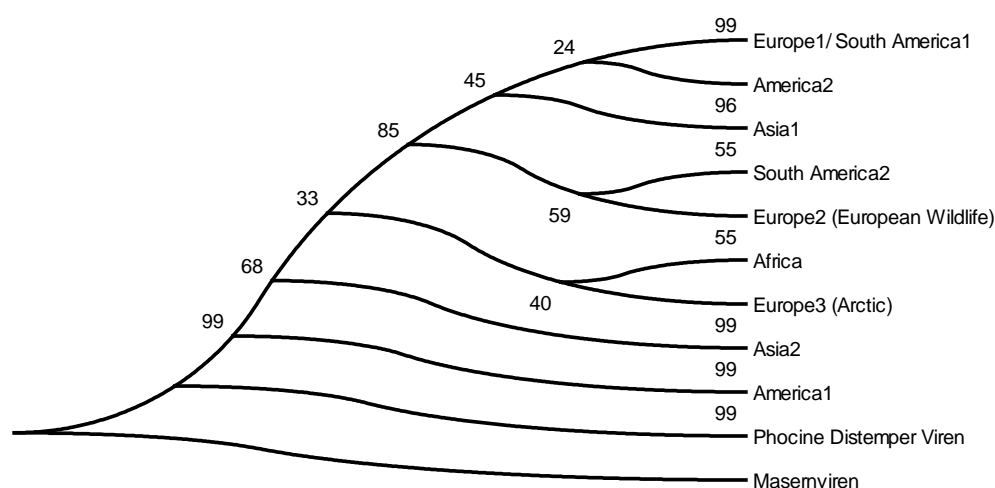


Abbildung 4: Phylogenetischer Stammbaum kompletter H-Gene verschiedener Staupestämme. Hier sind die neun genetischen Linien mit zwei Outgroups in komprimierten Teilbäumen dargestellt. Die verwendete statistische Methode ist Maximum Likelihood (Kimura-2) mit einer Testung (*Bootstrap*) von 2000, durchgeführt mit MEGA5.

Die relativ stark konservierten Bereiche der Rezeptorflächen des Hämagglutinins weisen wichtige Epitope auf, die vor allem bei Masernviren gezeigt wurden (Tahara et al., 2013; Hashiguchi et al., 2007; Langedijk et al., 1997; Sheshberadaran et al., 1986). Versuche mit rekombinanten, hämagglutinin-exprimierenden Vektorvakzinen untersuchten die resultierende Immunität (Sawatski et al., 2010; Weidinger et al., 2001; Welter et al., 2000; Pardo et al., 1997; Stephenson et al., 1997; Taylor et al., 1992; Taylor et al., 1991).

3.2 Fusions-Protein

Das F-Gen ist 1989bp lang und das daraus entstehende Vorläuferprotein hat eine Länge von 662 Aminosäuren. Das CDV-F-Potein ist ein typisches virales Typ-1 Fusions-Glykoprotein (Lamb et al., 2007). Dessen 135 Aminosäuren langes Signalpeptid vermittelt die Synthese des Proteins in das endoplasmatische Retikulum. Im zellulären trans-Golgi-Netzwerk wird das Signalpeptid an einer spezifischen cleavage site abgespalten, so dass das F0-Protein entsteht (siehe Abbildung 5 oben). Dieses wird anschließend von der ubiquitären zellulären Endoprotease Furin in die zwei Untereinheiten F1 und F2 gespalten (gelber Pfeil), wodurch N-terminal am F1 das Fusionspeptid (blau) freigelegt wird (Lamb et al., 2007). Die beiden Untereinheiten bleiben über Disulfidbrücken miteinander verbunden (siehe Abbildung 5 unten). Die Bildung von Homotrimeren lassen schließlich das funktionelle Fusionsprotein entstehen (Dutch, 2010).

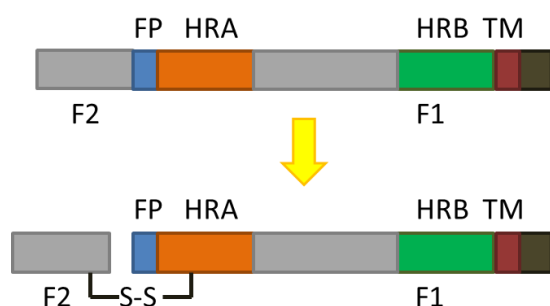


Abbildung 5: enzymatische Spaltung von Paramyxovirus F-Protein (modifiziert nach Dutch et al., 2010). Wie in dieser Abbildung dargestellt entstehen durch die Spaltung mit Furin (Pfeil) die beiden Untereinheiten F1 und F2, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. FP: Fusionspeptid, HR-A und HR-B: Heptad-Repeats, TM: Transmembrandomäne

Die beiden hydrophoben Bereiche HRA und HRB ermöglichen eine metastabile Präfusions-Konformation (wie in Abbildung 6A. im dreidimensionalen Strukturmodell und Abbildung 6B. schematisch dargestellt) (Chang et al., 2012). Das Fusionsprotein wird vom kotranslatierten Hämagglutininprotein, welches bereits im endoplasmatischen Retikulum mit ihm über den intrazellulären Transport bis zur Zellmembran interagiert, in dieser Stellung gehalten (Plempner et al., 2001). An den Stellen der später erfolgenden Knospung werden sie auch gemeinsam, unter Vermittlung des Matrixproteins, in die Zellmembran eingelagert (Battisti et al., 2012, Dietzel et al., 2011; Harrison et al., 2010).

Neue Erkenntnisse über das Zusammenwirken der Komponenten des sogenannten Fusionskomplexes, bestehend aus dem Homotrimer des Fusionsproteins und dem Homotetramer des Hämagglutininproteins, sind in Abbildung 6 veranschaulicht, wobei

zugunsten der Übersichtlichkeit auf die Darstellung des H-Protein-Tetramers verzichtet wurde.

Kann nun das kovalent an das F-Protein gebundene H-Protein einen passenden Rezeptor binden, wird nicht nur die für die Fusion wichtige Nähe zur Zellmembran hergestellt, sondern auch eine Konformationsänderung im Hämagglutinin bewirkt, welche zum Dissoziieren des H-Proteins vom Fusionskomplex führt. Außerdem wird über die Triggerzonen am Stiel des Hämagglutinins das Herausschnellen des HRA-Bereiches (orange) bewirkt, der nun das Fusionspeptid (blau) präsentiert (Plemper et al., 2011). Diese nun entstandene open stalk-Form (Abbildung 6C.) kann über das Eindringen des Fusionspeptids in die Zellmembran der zu infizierenden Zelle den Fusionsprozess beginnen. Dieser komplexe Vorgang geschieht vielmals auf der nun entstandenen Berührungsfläche zwischen Zellmembran und Virushülle, wodurch der in Abbildung 6D. dargestellte lipid stalk, ein Übergangszustand der Membranfusion entsteht. Die treibende Kraft hinter der damit hervorgerufenen Fusionspore liegt in der höchststabilen 6-HB-Form (6-Helicesbündel) der Heptad-Repeat-Bereiche. Die hydrophoben Anteile HRA und HRB schnappen in diese energetisch günstige Position, womit schließlich die stabile Postfusions-Konformation des Fusionsproteins (Abbildung 6E.) und damit die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran der infizierbaren Zelle erreicht werden (Brindley et al., 2012; Chang et al., 2012; Messling et al., 2004).

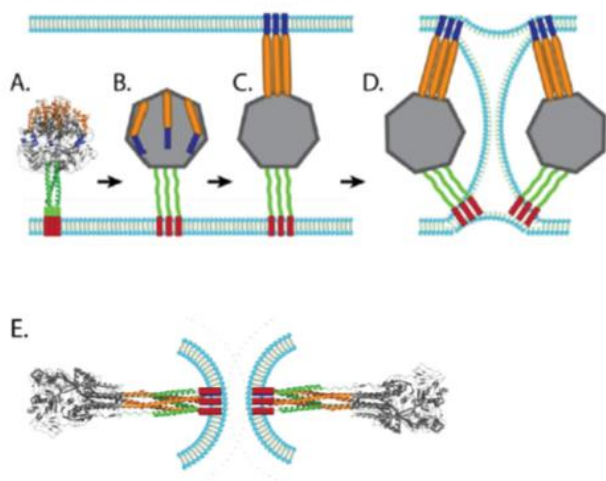


Abbildung 6: Schematischer Vorgang der Fusion bei Paramyxoviren (Chang et al., 2012).

Die farblich markierten Anteile im Verlauf dieses Geschehens entsprechen denen aus Abb. 5.

A: dreidimensionales Strukturmodell der metastabilen Präfusions-Konformation des Fusionsprotein-Trimers

B: schematische Darstellung der Präfusions-Konformation

C: nach Bindung eines Rezeptors durch das Hämagglutinin wird das Fusionsprotein aktiviert, es nimmt die *open stalk*-Form an und die nun freiliegenden Fusionspeptide dringen in die Zellmembran der Wirtszelle ein.

D: durch das zusammenklappen mehrerer mit der Zellmembran verbundener Fusionsproteine in die Postfusions-Konformation entsteht der sogenannte lipid stalk, eine instabile Übergangsform des *lipid layers*.

E: erfolgte Fusion mit dreidimensionalen Strukturmodellen der stabilen Postfusions-Konformation

Diese im Wesentlichen von seiner Tertiär- und Quartärstruktur abhängige Funktion bedingt den hohen Konservierungsgrad des F-Gens, da Mutationen zu Fehlfunktionen des Proteins führen können (Plattet et al., 2009; Plattet et al., 2007). Die Variabilität liegt bei nur 4% (Messling et al., 2001), wobei diese vor allem im Bereich des Signalpeptids, also den ersten 135 Aminosäuren (Panzer et al., 2012; Lee et al., 2010; Messling et al., 2002), dem der Transmembrandomäne oder dem des zytoplasmatischen Fortsatzes lokalisiert sind. Modifikationen in diesen Bereichen beeinflussen die Fusogenität des Proteins (Anderson et al., 2008; Messling et al., 2004; Messling et al., 2002; Cathomen et al., 1997), aber auch den Einbau in Virushüllen beim *Assembly* (Cathomen et al., 1997).

Alle Zellmembranen der Eukaryoten sind im Wesentlichen gleich aufgebaut. Deshalb sind Anpassungen an andere Zellen oder Wirte durch größere Modifikationen des Fusionsproteins auch bei einem veränderten Tropismus nicht notwendig (Bowden et al., 2011).

Durch die starke Konservierung des Fusionsproteins lässt sich die Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen verwandte Morbilliviren (Sheshberadaran et al., 1986; Norrby et al., 1986) bzw. auch der mögliche Schutz gegen Erkrankungen erklären, die durch verwandte Morbilliviren ausgelöst werden (deGuise et al., 2004; Ghosh et al., 2001; Jones et al., 1997; Blixenkrone-Møller et al., 1992).

Epitope auf dem Fusionsprotein des Staupevirus sind beschrieben (Ghosh et al., 2001; Örvell et al., 1985). In Versuchen mit rekombinanten Vektorvakzinen verschiedener Morbilliviren wurde die resultierende Immunogenität untersucht (Chandran et al., 2009; Welter et al., 2000; Pardo et al., 1997; Stephenson et al., 1997; Obeid et al., 1995; Wild et al., 1993; Wild et al., 1992; Taylor et al., 1992; Taylor et al., 1991).

3.3 Matrix-Gen

Das stark konservierte M-Gen des Staupevirus hat eine Länge von 1008bp. Das resultierende Protein von 335AA hat ein Molekulargewicht von ca. 38kDa. Es vermittelt im Virion die Bindung zwischen der Hülle und dem Nukleokapsid (Lamb et al., 2007). Bei verwandten Paramyxoviren wurden verschiedene Anordnungen der vermittelnden Proteine in den Virionen gefunden. Liljeroos et al. (2011) berichtet von einer Hüllstruktur des M-Proteins um das Nukleokapsid, wohingegen Battisti et al. (2012) das klassische Bild der Matrixschicht an der Innenseite der Hülle zeigen. In beiden Fällen konnte die bilaterale Natur des M-Proteins aufgezeigt werden.

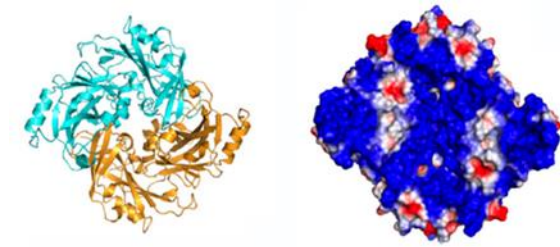


Abbildung 7: Matrix-Protein-Dimere und ihre Ladungsverteilung (Battisti et al., 2012).

links: Konfiguration eines Matrix-Protein-Homodimers, Monomere in türkis und gold dargestellt

rechts: Ladungsverteilung innerhalb des Dimers, negative Gesamtladung in rot und positive in blau

Die eine, vorwiegend negative Gesamtladung aufweisende, Seite eines M-Protein-Dimers (Abbildung 7 links) ist der Zellmembran (bzw. der Hülle im Virion) zugewandt, während die positiven Gesamtladungen in Richtung Nukleokapsid bzw. Zytosol zeigen (Abbildung 7 rechts). Durch diese besondere Form der Dimerisation aggregieren die Matrix-Protein-Dimere zu parakristallinen flächigen Strukturen, wie in Abbildung 8 in einem dreidimensionalen Modell gezeigt. Diese parakristallinen Gitter weisen regelmäßige Lücken auf. In diese sind die Glykoproteine H und F eingelagert. Die Verankerung von Hämagglutinin- und Fusions-Proteinen erfolgt hierbei über die jeweiligen zytosolischen Fortsätze (Battisti et al., 2012; Dietzel et al., 2011; Harrison et al., 2010).

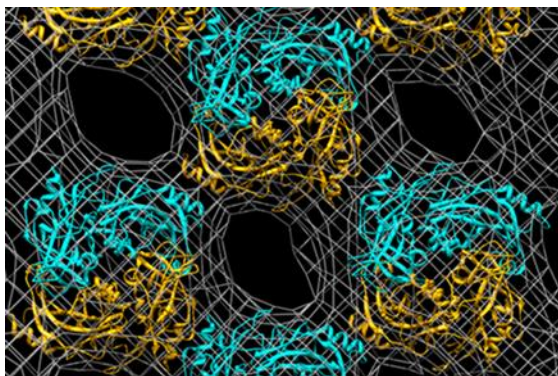


Abbildung 8: parakristalline Struktur, der sich aggregierenden M-Homodimere (Battisti et al., 2012).

Das Matrix-Protein nimmt damit eine Schlüsselrolle beim Zusammenbau (*Assembly*) und der Knospung (*Budding*) der Paramyxoviren ein (Dietzel et al., 2011; Harrison et al., 2010; Naim et al., 2000; Tahara et al., 1997). Es ist für die Lokalisation der Knospungs-Stellen in polarisierten Epithelzellen verantwortlich (Harrison et al., 2010), reguliert im Zusammenspiel mit dem F-Protein den Zusammenbau (Tahara et al., 2007) und damit auch die Infektiösität der gebildeten Partikel (Dietzel et al., 2011). Außerdem dient das M-Protein im Virion als Transportsicherung und ist damit auch am Vorgang der Fusion beteiligt. Es muss das F-Protein freigeben, damit dies seine Konformationsänderungen während des Vorgangs der Fusion

durchführen kann (Battisti et al., 2012).

Durch Mutationen in der Sequenz des M-Gens kann ein klinisches Bild ähnlich der SSPE (subakute sklerosierende Panenzephalitis; als mögliche Spätfolge einer Masernerkrankung) hervorgerufen werden. Dies scheint durch das Herunterregeln der Transkription der Virus-RNA und der damit einhergehenden Möglichkeit einer Persistenz zu geschehen. Außerdem wird durch derartige Veränderungen des Matrix-Proteins auch eine Ausbreitung im ZNS ermöglicht (Cathomen et al., 1998; Cathomen et al., 1998; Stettler et al., 1997; Tahara et al., 1997; Katz et al., 1970).

Dass Epitope auf dem Matrix-Protein existieren und es damit im Stande ist, eine Immunantwort hervorzurufen, konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden (Wild et al., 1993; Rima et al., 1987; Sheshberadaran et al., 1986). Es vermittelt eine IgA-basierte Immunantwort (Zhou et al., 2011), die zum einen bereits das Angehen (*take*) einer Infektion verhindern könnte und zum anderen keine Entzündungsreaktion hervorruft (van Riet et al., 2012). Die Immunität der Schleimhäute und das Zusammenwirken mit dem Immunsystem des restlichen Körpers sind jedoch äußerst komplex und bedürfen weiterer Forschung (Els et al., 2011; Zhou et al., 2011).

4 Infektionsweg und Klinik der Krankheit

Der übliche Übertragungsweg der Staupe ist als Tröpfcheninfektion beschrieben (Appel et al., 1995). Eine aktuelle Veröffentlichung legt jedoch auch die Möglichkeit einer Übertragung über Insekten (Flöhe) als Vektoren nahe (Trebbien et al., 2014). Tatsächlich werden die behüllten Viren vorwiegend über die Schleimhäute des Respirations- und des oberen Gastrointestinaltraktes aufgenommen. Primäres Infektionsziel stellen dabei aktivierte Immunzellen (Dendritische Zellen, Makrophagen und Leukozyten) der lymphatischen und lymphoretikulären Gewebe und Organe dar (Ludlow et al., 2012; Lemon et al., 2011; Ferreira et al., 2010; de Vries et al., 2010; deSwart et al., 2007; Messling et al., 2004). Sekundär kommt es zur Besiedelung der epithelialen Gewebe (Langedijk et al., 2011; Rivals et al., 2007; Engelhardt et al., 2005; Gröne et al., 2003). Als dritte Stufe der Infektion wird die Vermehrung in Zellen des Zentralen Nervensystems angesehen. Hier scheint es vor allem zwei mögliche Wege zu geben. Zum einen hämatogen über die Blut-Liquor-Schranke (Rudd et al., 2006; Appel, 1969) und zum anderen über die Nervenzellen des Riechkolbens (Techangamsuwan et al., 2009; Bonami et al., 2007; Rudd et al., 2006; Axthelm et al., 1987).

Der zeitliche Ablauf und die Ausprägung einer Staupevirusinfektion variieren durch den Einfluss vieler Faktoren, wie dem Infektionsdruck, dem CDV-Stamm, der infizierten Spezies und dem Zustand des Immunsystems. Denn abhängig von der Geschwindigkeit der Reaktion des Immunsystems und der damit verbundenen schnellen *Clearance* des Erregers kommt es weder zu einer ausgeprägten Virämie noch zu einem Fortschreiten der Pathogenese (Messling et al., 2003; Appel und Gillespie, 1972; Rockborn et al., 1956).

Dementsprechend ist die Bandbreite der möglichen Mortalität recht groß. Sie liegt zwischen 5 und 100%. Die Mortalität ist für Makaken mit 5% angegeben (Qiu et al., 2011). Bei infizierten Hunden liegt sie bei 50% und bei Frettchen bei 100% (Appel und Gillespie, 1972). Die als Reservoir dienenden Füchse haben eine Mortalität von 40% (Nouvellet et al., 2013).

Der Ablauf einer Infektion lässt sich dennoch folgendermaßen grob zusammenfassen:

Die Inkubationszeit beträgt meist zwischen zwei bis sieben Tage. Nach der Infektion der aktivierten Immunzellen im Bereich der Eintrittspforte erfolgt die weitere Replikation in den dendritischen Zellen, Makrophagen, B- und T-Zellen (vermehrt in B-Zellen, denn in T-Zellen) der lymphatischen und lymphoretikulären Gewebe und Organe. Die Virämiephase wird um den Tag vier (also meist zwischen Tag drei bis sechs) der Infektion beobachtet, die sich klinisch in einer Fieberzacke und Anorexie äußert (bei schweren Infektionen werden auch zwei Virämiephasen beobachtet). Die Viren sind dann in Mandeln, Trachea, Lunge, Thymus, Milz und Lymphknoten nachweisbar. Nach weiteren wenigen Tagen, also zwischen Tag fünf und zehn der Infektion, sind die Erreger auch in der Schleimhaut (vor allem der Maulhöhle), der Haut, der Magen- und Blasenwand zu finden, weshalb alle Se- und Exkrete infizierter Tiere infektiös sind. Die epitheliale Ausbreitung kann bei Frettchen am typischen Hautausschlag (vor allem im Kehlbereich) erkannt werden. Die Virusausscheidung beginnt um den siebten Tag (de Swart et al., 2007; Rivals et al., 2007; Messling et al., 2004; Gröne et al., 2003; Messling et al., 2003; Appel und Gillespie, 1972; Liu et al., 1957; Rockborn et al., 1956; Carré, 1905).

Aufgrund einer virusinduzierten Immunsuppression (Leukopenie, v. a. Lymphopenie) kommt es häufig zu Sekundärinfektionen (de Swart et al., 2007; Okada et al., 2000; Kauffman et al., 1982). Die Immunsuppression kann bei Hunden bis zu mehreren Wochen nach der *Clearance* des Virus ausgeprägt sein (Schobesberger et al., 2005; McCullough et al., 1974).

Eine Staupe-Erkrankung kann sich nicht zuletzt dadurch durch eine Vielzahl von Symptomen äußern (Appel und Gillespie, 1972; Kirk, 1922; Blaine, 1871). Die meisten Wildtiere fallen meist erst dadurch auf, dass sie aufgrund von Ataxien oder neurologischen Symptomen

gefangen (Di Sabatino et al., 2014; Cha et al., 2012), geschossen (Daoust et al., 2009) oder von anderen Tieren gerissen werden (Füchse gerissen: von Wölfen, Zoo Basel; von Tiger, Zoo Magdeburg; von Gepard, Tierpark Erfurt; jeweils mündl. Kommunikation des betreuenden Tierarztes). Fließende Übergänge in der Klinik sind die Regel. Dementsprechend schwer ist eine klare Definition von klinischen Manifestationsformen.

Mit der folgenden Darstellung (Tabelle 1) soll dennoch der Versuch unternommen werden.

Tabelle 1: klinische Manifestationsformen

Katarrhalische Form (respiratorische und intestinale Form) Entzündung der oberen Atemwege, Tonsillitis Bronchitis, Bronchopneumonie Konjunktivitis Augen- und Nasenausfluss Laryngitis, Pharyngitis Erbrechen, Diarrhoe Dehydratation, Kreislaufprobleme
Zentralnervöse Form (Staupe-Enzephalitis) Verhaltensänderungen, Zwangsbewegungen Tics, Krämpfe, Zittern, Krampfanfälle Ataxie, Lahmheit, partielle oder komplette Paralyse
Old Dog Encephalitis (ODE) persistente Infektion des ZNS progressiver motorischer und mentaler Verfall letal Verlauf
kutane und lokale Manifestationen Pustulöse Dermatitis Hyperkeratosen an Ballen und Nasenspiegel (Hard pad disease) Staupegebiss bei Welpen (Zahnschmelzhypoplasie mit Braunfärbungen)

5 Epidemiologie

Die derzeitige geographische Verbreitung der Staupe ist fast als global zu bezeichnen. Es gibt zahlreiche Nachweise aus Europa (Martella et al., 2010), Afrika (Morell et al., 1994), Asien (Kameo et al., 2012), Nord- (Roscoe et al., 1993) und Südamerika (Negrao et al., 2013), sowie sogar aus Australien (Norris et al., 2006) und dem Nordpolarmeer (Akerstedt et al., 2010; Tryland et al., 2005).

Je nach Verbreitung sind verschiedene Spezies als Primärwirte zu nennen, die für die Vermehrung und Verbreitung des Virus sorgen. Dies sind Füchse (Trebbien et al., 2014; Billinis et al., 2013; Denzin et al., 2013; Nouvoullet et al., 2013; Martella et al., 2010; Megid et al., 2010; Megid et al., 2009; Ferreyra et al., 2009; Sobrino et al., 2008; Damien et al., 2002; Davidson et al., 1993; Davidson et al., 1992; Halbrooks et al., 1981), Waschbären (Lednický et al., 2004; Roscoe et al., 1993; Cranfield et al., 1984; Karstad et al., 1964), Marderhunde (Trebbien et al., 2014; Guo et al., 2013; Cha et al., 2012; Ohashi et al., 2001) und Hunde (Jozwik et al., 2004; Jozwik et al., 2002; Alexander et al., 1994; Blixenkrone-Møller et al., 1993). Dabei liegt die Prävalenz bei Füchsen in Europa nach verschiedenen Studien zwischen 4 und 26% (Santos et al., 2009; Sobrino et al., 2008; Damien et al., 2002; Truyen et al., 1998). Eine Untersuchung in Deutschland erbrachte in ihren Proben (Testung per RT-PCR) der untersuchten Füchse in Sachsen-Anhalt sogar ein Maximum von 70% und eine durchschnittliche Prävalenz von 30% (Denzin et al., 2013). Aufgrund von Paarungszeit (Frühjahr) und Jungenwanderung (Herbst) der Reservoirs lässt sich die Varianz als zweigipfelige Verteilung des Auftretens von Staupefällen im jahreszeitlichen Verlauf darstellen (Roscoe et al., 1993; Davidson et al., 1992).

Die geographisch weite Verbreitung der Staupe wurde zu Beginn des Kapitels dargelegt. Aber auch die Ausbreitung im Sinne eines Wirtsspektrums ist sehr groß (Harder et al., 1997). Sie umfasst den größten Teil der 16 rezenten Familien der Ordnung der Raubtiere (*Carnivora*) und vereinzelt weitere Gattungen, wie die Makaken. Die folgende Auflistung (Tabelle 2: natürliche Infektionen) der natürlichen Infektionen, die in der Literatur beschrieben sind, umfasst auch die jeweils geführten Nachweise. Dabei wurde auf die Form des Nachweises Wert gelegt, der in der jeweiligen Veröffentlichung verwendet wurde. Deshalb enthält sie auch keine Berichte, die sich ausschließlich auf serologische Daten beziehen. Der unterschiedliche Informationsgehalt der Nachweise wurde in Klassen eingeteilt, deren Erklärungen in der Legende am Ende der Tabelle gegeben sind.

Tabelle 2: natürliche Infektionen in der Literatur

Erstautor	Jahr	Tierart	Nachweis
Alexander, K. A.	1994	Afrik. Wildhund (<i>Lycaon pictus</i>)	nur klinisch
Alexander, K. A.	1996	Afrik. Wildhund (<i>Lycaon pictus</i>)	IC (mABs)
An, D. J.	2008	Marder	H-Gen Seq
Appel, M. J.	1991	Halsbandpekari (<i>Pecari tajacu</i>)	IC (mABs)
Appel, M. J.	1994	Löwe (<i>Panthera leo</i>), Tiger (<i>Panthera tigris</i>), Leopard (<i>Panthera pardus</i>), Jaguar (<i>Panthera onca</i>)	IC (mABs)
Bae, C. W.	2013	Asiatische Dachs (<i>Meles leucurus</i>)	H-Gen Seq
Barrett, T.	2004	Kalifornischer Seelöwe (<i>Zalophus californianus</i>)	IC (mABs), RT-PCR
Benetka, V.	2013	Dachs (<i>Meles meles</i>)	H-Gen Seq
Billinis, C.	2013	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>)	H-Gen Seq
Blythe, L. L.	1983	Bengaltiger (<i>Panthera tigris tigris</i>)	klinisch, Neuropatho
Butina, T. V.	2010	Baikalrobbe (<i>Phoca sibirica</i>)	RT-PCR
Carpenter, M. A.	1998	Löwe (<i>Panthera leo</i>), Tüpfelhyäne (<i>Crocota crocuta</i>), Löffelhund (<i>Otocyon megalotis</i>)	klinisch, RT-PCR
Cha, S. Y.	2012	Marderhund (<i>Nyctereutes procyonoides</i>)	klinisch, H-Gen-Seq
Chandra, A. M.	2000	Binturong (<i>Arctictis binturong</i>)	IC (mABs), ELMI, LM
Chen, C. C.	2008	Chinesischer Sonnendachs (<i>Melogale moschata subauantiaca</i>)	klinisch, RT-PCR
Cottrell, W. O.	2013	Schwarzbär (<i>Ursus americana</i>)	klinisch, RT-PCR, Patho, ESK, Neuropatho
Cranfield, M. R.	1984	Waschbär (<i>Procyon lotor</i>)	klinisch, ESK, Patho
Daoust, P. Y.	2009	Kanadischer Luchs (<i>Lynx canadensis</i>), Rotluchs (<i>Lynx rufus</i>)	klinisch, ESK, Patho, RT-PCR
Davidson, W. R.	1992	Graufuchs (<i>Urocyon cinereoargenteus</i>)	ESK, Patho, IFAT
Denzin, N.	2013	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>)	RT-PCR
Diters, R. W.	1978	Stinktief (<i>Mephitis mephitis</i>)	ESK, Patho
Ferreira, H.	2009	Krabbenfuchs oder Maikong (<i>Cerdocyon thous</i>)	klinisch, IFAT, RT-PCR
Fix, A. S.	1989	Leopard (<i>Panthera uncia</i>)	ESK, Patho, IFAT, ELMI
Forsyth, M. A.	1998	Kaspische Robbe (<i>Pusa caspica</i> , <i>Phoca caspica</i>)	RT-PCR
Frölich, K.	2000	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>), Dachs (<i>Meles meles</i>), Steinmarder (<i>Martes foina</i>)	RT-PCR
Goller, K. V.	2010	Afrik. Wildhund (Hyänenhund) (<i>Lycaon pictus</i>)	klinisch, ESK, Patho, RT-PCR, ICH
Gould, D. H.	1983	Sibirischer Tiger (<i>Panthera tigris altaica</i>)	wahrsch ELMI
Gowtage-Sequeira, S.	2009	Schabrackenschakal (<i>Canis mesomelas</i>)	ESK, RT-PCR
Guo, L.	2013	Großer Panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>), Marderhund (Enok) (<i>Nyctereutes procyonoides</i>)	RT-PCR
Haas, L.	1996	Tüpfelhyäne (<i>Crocota crocuta</i>)	IHC, RT-PCR
Hammer, A. S.	2004	Dachs (<i>Meles meles</i>)	klinisch, RT-PCR, IFAT, Patho

Harder, T. C.	1995	Löwe (<i>Panthera leo</i>)	RT-PCR
Harder, T. C.	1996	Löwe (<i>Panthera leo</i>), Chinesischer Leopard (<i>Panthera pardus japonensis</i>), Graufuchs (<i>Urocyon cinereoargenteus</i>), Leopard (<i>Panthera pardus</i>)	H-Gen Seq
Hirama, K.	2004	Larvenroller (<i>Paguma larvata</i>)	H-Gen Seq
Hoff, G. L.	1974	Graufuchs (<i>Urocyon cinereoargenteus</i>), Waschbär (<i>Procyon lotor</i>)	klinisch, Patho, ESK
Hur, K.	1999	Binturong (<i>Arctictis binturong</i>)	klinisch, Patho, ESK, IFAT
Kameo, Y.	2012	Marderhund (<i>Nyctereutes procyonoides</i>), Sibirisches Feuerwiesel (<i>Mustela sibirica</i>)	H-Gen Seq
Keller, S. M.	2012	Fischermarder (<i>Martes pennanti</i>)	klinisch, ESK, Patho, RT-PCR, IHC
Kennedy, S.	2000	Kaspische Robbe (<i>Pusa caspica</i> , <i>Phoca caspica</i>)	klinisch, ESK, Patho, RT-PCR
Lednicky, J. A.	2004	Waschbär (<i>Procyon lotor</i>)	klinisch, ESK, Patho, RT-PCR, H-Gen Seq
Mamaev, L. V.	1995	Baikalrobbe (Baikal-Ringelrobbe) (<i>Pusa sibirica</i> , <i>Phoca sibirica</i>)	H-Gen Seq
Martella, V.	2010	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>)	klinisch, RT-PCR, H-Gen Seq
Megid, J.	2010	Brasilianischer Kampffuchs (<i>Lycalopex vetulus</i>)	klinisch, Patho, RT-PCR
Megid, J.	2009	Krabbenfuchs oder Maikong (<i>Cerdocyon thous</i>)	klinisch, Patho, RT-PCR
Meli, M. L.	2010	Iberischer Luchs (<i>Lynx pardinus</i>), Steinmarder (<i>Martes foina</i>)	RT-PCR, H-Gen Seq
Monne, I.	2011	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>), Dachs (<i>Meles meles</i>), Steinmarder (<i>Martes foina</i>)	RT-PCR, H-Gen Seq (ca1700bp)
Mos, L.	2003	Nordamerikanischer Fischotter (<i>Lontra canadensis</i>), Waschbär (<i>Procyon lotor</i>)	klinisch, ESK, Patho, RT-PCR, IHC
Müller, A.	2011	Wolf (<i>Canis lupus</i>)	H-Gen Seq
Myers, D. L.	1997	Löwe (<i>Panthera leo</i>) und Tiger (<i>Panthera tigris</i>)	IC (mABs)
Nagao, Y.	2012	Tiger (<i>Panthera tigris</i>)	klinisch, Patho, H-Gen Seq
Nikolin, V. M.	2012	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>), Waschbär (<i>Procyon lotor</i>)	RT-PCR
Nouvellet, P.	2013	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>)	RT-PCR, IFAT
Ohashi, K.	2001	Marderhund (Enok) (<i>Nyctereutes procyonoides</i>)	H-Gen Seq
Origgi, F. C.	2013	Langschwanzmurmeltier (Rotes Murmeltier) (<i>Marmota caudata</i>)	H-Gen Seq, ESK
Origgi, F. C.	2012	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>), Steinmarder (<i>Martes foina</i>), Dachs (<i>Meles meles</i>)	Patho, IHC, RT-PCR, ESK, H-Gen Seq
Quigley, K. S.	2010	Sibirische Tiger (<i>Panthera tigris altaica</i>)	IFAT, ESK Neuropatho
Roelke-Parker, M. E.	1996	Goldschakal (<i>Canis aureus</i>), Schabrackenschakal (<i>Canis mesomelas</i>), Löwe (<i>Panthera leo</i>), Löffelhund (<i>Otocyon megalotis</i>), Tüpfelhyäne (<i>Crocota crocuta</i>)	Patho, Virusisolierung
Roscoe, D. E.	1993	Waschbär (<i>Procyon lotor</i>), Graufuchs (<i>Urocyon cinereoargenteus</i>), Streifenskunk (<i>Mephitis mephitis</i>), Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>)	klinisch, Patho, ESK, Virusisolierung

Sakai, K.	2013	Javaneraffen (<i>Macaca fascicularis</i>)	klinisch, Patho, ESK, Virusisolierung, IHC, H-Gen Seq
Schönbauer, M.	1984	Eisbär (<i>Ursus maritimus</i>), Brillenbär (<i>Tremarctos ornatus</i>)	IFAT, Virusisolierung (embryonierte Hühnereier)
Seimon, T. A.	2013	Sibirischer Tiger (Amurtiger) (<i>Panthera tigris altaica</i>)	klinisch, RT-PCR, IHC, ISH
Sun, Z.	2010	Rhesusaffe (<i>Macaca mulatta</i>)	klinisch, Patho, RT-PCR
Takayama, I.	2009	Larvenroller (<i>Paguma larvata</i>)	klinisch, Patho, ESK, Virusisolierung, H-Gen Seq
Timm, S. F.	2009	Insel-Graufuchs (Kalifornischer Insel-Graufuchs) (<i>Urocyon littoralis catalinae</i>)	Patho, RT-PCR
van Moll, P.	1995	Steinmarder (<i>Martes foina</i>), Dachs (<i>Meles meles</i>), Frettchen (<i>Mustela putorius furo</i>), Wiesel	Neuropatho, IHC
Woo, G. H.	2010	Fennek (<i>Vulpes zerda</i>)	klinisch, Patho, ESK, ICH
Wood, S. L.	1995	Löwe (<i>Panthera leo</i>)	klinisch, ESK, ICH, RT-PCR
Yoshikawa, Y.	1989	Japanmakak (Schneeeffe oder Rotgesichtsmakak) (<i>Macaca fuscata</i>)	klinisch, Patho, ESK

Legende:

ELMI	Elektronenmikroskop
ESK	Einschlusskörperchen
H-Gen Seq	Sequenzierung des Hämagglutinins
IC (mABs)	Immunchemie (monoklonale Antikörper)
IFAT	Immunfluoreszenz-Antikörpertest
IHC	Immunhistochemie
LM	Lichtmikroskop
Neuropatho	Neuropathologie
Patho	Pathologie
RT-PCR	reverse Transkriptions-PCR
Virusisolierung	Isolierung des infektiösen Agens

Gerade die Infektionen eher untypischer Wirte wachsen sich zu Epizootien größeren Ausmaßes aus und sorgen damit für hohe Verluste, wie z. B. bei Baikalrobben (Grachev et al., 1989), bei Kaspischen Robben (Kennedy et al., 2000), bei Löwen (Munson et al., 2008) oder Rhesusaffen (Qiu et al., 2011).

Echte Schweine (Suidae) und Hauskatzen (*Felis catus*) sind auf künstlichem Wege infizierbar, wobei die Infektion aber meist mild oder nur subklinisch verläuft (Appel et al., 1974).

Wie unter Punkt 3.1 über das Hämagglutinin besprochen, ist eine Besonderheit der Morbilliviren die Rezeptorbindung des *Attachment*-Proteins, wodurch der Zell- und Wirtstropismus festgelegt wird (Messling et al., 2004; Messling et al., 2001). Damit wird der Rahmen des Wirtsspektrums des Staupevirus bestimmt. Staupe trägt jedoch Merkmale einer Faktorenkrankheit.

Denn gerade bei Infektionen untypischer Wirte spielt der Immunstatus eine große Rolle. Die Schwächung des Immunsystems kann z.B. durch eine Schädigung von Toxinen (de Swart et al., 1994; Kreutzer et al., 2008) oder Infektion mit anderen Viren (Origgi et al., 2013; Wiener et al., 2013; Fix et al., 1989) bzw. Infestation mit Parasiten (Gianitti et al., 2011; Munson et al., 2008; van Heerden et al., 1989) bedingt sein. Bereits 1966 wurde von Gorham eine Mangelernährung als möglicher negativer Einflussfaktor auf das Immunsystem und damit als infektionsbegünstigend genannt (Gorham et al., 1966). Bei den meisten Fällen lassen sich jedoch retrospektiv der zeitliche Ablauf und damit der primär auslösende Faktor nicht mehr zweifelsfrei klären.

Plausibel wird jedoch das Angehen einer Staupevirusinfektion in einem Wirt mit einem vorgeschädigten Immunsystem durch folgende drei Argumente:

Zum einen ist der primäre Rezeptor des H-Proteins das CD150/SLAM-Molekül, welches auf bereits aktivierten Immunzellen vorkommt und die damit bei einem bereits reagierenden Immunsystem abundant vorhanden sind (de Swart et al., 2007; Messling et al., 2004).

Zum zweiten ist das Staupevirus auf Cholesterol in der Hülle angewiesen (Imhoff et al., 2007), welches bei Stress und Krankheit vermehrt in die Zellmembranen eingebaut wird.

Zum dritten bedingt ein angeschlagenes Immunsystem eine längere Verweildauer im Körper des Wirtes, bevor es zu einer etwaigen *Clearance* kommt, mit der dann die Chance steigt, dass auch nicht effektive Rezeptorbindungen des Hämagglutinins (also mit einer geringeren Affinität) zu einem Angehen (*take*) der Infektion führen können (Bonami et al., 2007; Yanagi et al., 2006; Takeuchi et al., 2003; Hashimoto et al., 2002).

Diese angeführten Argumente gelten im Grundsatz natürlich auch für andere Morbilliviren. Schon früh wurde die verwandtschaftliche Nähe der verschiedenen Vertreter der Morbilliviren untereinander untersucht (Barrett et al., 1999; Blixenkrone-Møller et al., 1992; Sheshberadaran et al., 1986; Norrby et al., 1986; Norrby et al., 1985; Nicolle, 1931). Die Kreuzreaktivität ihrer Antikörper wurde auch versuchsweise zur Immunprophylaxe bzw. als Tiermodell eingesetzt (de Vries et al., 2014; Chandran et al., 2010; DeGuise et al., 2004; Jones et al., 1997; Stern et al., 1995; Chalmers et al., 1994; Yamanochi et al., 1979; Moura et al., 1961; Millian et al., 1960; Dalldorf et al., 1938). Die Verwandtschaftsverhältnisse im Genus Morbillivirus sind in Abbildung 9 in einem phylogenetischen Stammbaum dargestellt.

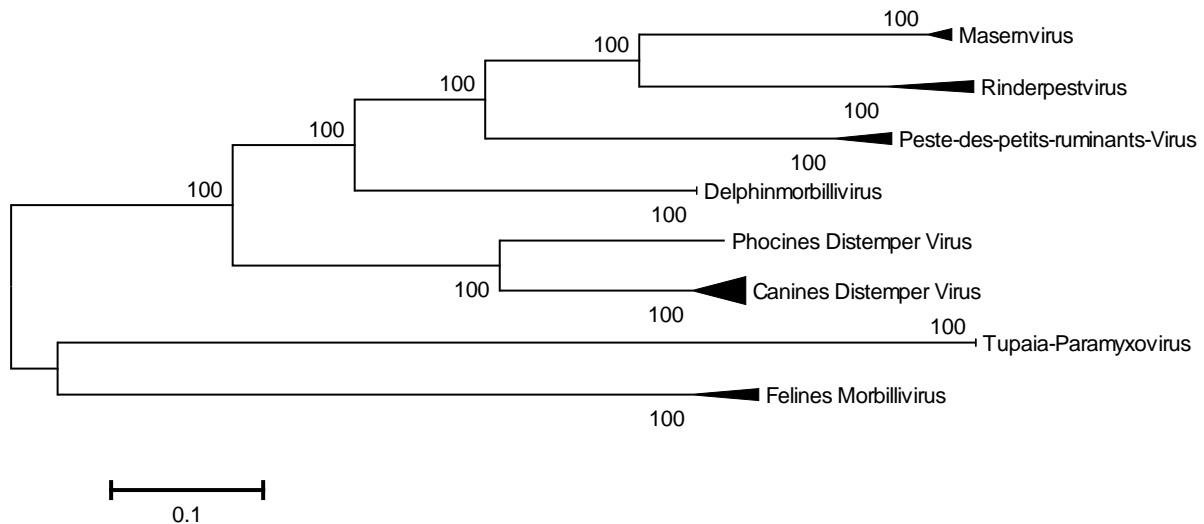


Abbildung 9: Phylogenetischer Stammbaum aufgrund der Genome verwandter Morbilliviren
 Diese Darstellung von sechs Morbilliviren mit zwei Outgroups in komprimierten Teilbäumen verdeutlicht die Verwandtschaftsverhältnisse. Die verwendete statistische Methode ist Maximum Likelihood (Kimura-2) mit einer Testung (*Bootstrap*) von 2000, durchgeführt mit MEGA5.

Diese verwandtschaftliche Nähe scheint denn auch dafür verantwortlich zu sein, dass es immer wieder Berichte von Überschreitungen der Speziesbarriere durch verschiedene Morbilliviren gibt (de Vries et al., 2014; Balamurugan et al., 2012; Kreutzer et al., 2008; Svansson et al., 1993; Blixenkrone-Møller et al., 1990; Örvell et al., 1990; Blixenkrone-Møller et al., 1989).

6 Therapie und Prophylaxe

6.1 Therapie

Eine kausale Therapie ist bei klinisch erkrankten Tieren nicht möglich. Es bleibt ausschließlich der Versuch der Stabilisierung des Patienten durch symptomatische Therapie. So scheint zum Beispiel die Supplementierung mit Vitamin A in der Lage, zu einer Besserung beitragen zu können (Rodeheffer et al., 2007).

Durch die ständige Gefahr des Erregereintrages und der fehlenden Möglichkeit einer kausalen Therapie ergibt sich als einziges adäquates Mittel zur Kontrolle der Staupe deshalb nur die Immunprophylaxe (Patel et al., 2012; Chappuis, 1995).

6.2 Immunprophylaxe

Die Aktive Immunisierung kann durch nicht vermehrungsfähige Impfstoffe (Inaktivat-Impfstoffe) mit inaktiviertem Virusmaterial oder durch Modifizierte Lebendvakzinen (MLV) mit attenuierten Virusstämmen erfolgen. Die ersten Versuche einer zielgerichteten Prophylaxe wurden mit Inaktivat-Impfstoffen unternommen. Die erste publizierte Vakzine gegen Staupe wurde 1923 durch Vittorio Puntoni erstellt und getestet, der formalin-inaktiviertes Material von Gehirnen erkrankter Hunde verimpfte (Puntoni, 1923). Dunkin und Laidlaw entwickelten dann 1929 die erste kommerzielle Vakzine (Laidlaw et al., 1931; Laidlaw et al., 1928). Das von ihnen entwickelte Impfrezime bestand aus der sogenannten Serum-Virus-Methode, also einer kombinierten passiv-aktiv Immunisierung. Zuerst wurde Serum verabreicht, anschließend wurde mit einem zellkultur-attenuierten MLV geboostert (Pinder, 1938).

Eine CDV-ISCOM (*immune stimulating complex*) Vakzine galt lange als sicher und eine belastbare Immunität induzierend. Der Impfstoff war bei Seehunden als gut einsetzbar getestet worden (Visser et al., 1992). Beim Einsatz dieser Vakzine im Rahmen des Zuchtprogramms für Afrikanische Wildhunde im Mkomazi Game Reserve (Tanzania, Afrika) verstarben jedoch 49 von 52 geimpften Tiere, trotz jährlich erfolgter Auffrischungsimpfung, am Eintrag eines Staupe-Feldstammes (van de Bildt et al., 2002).

Die erste MLV war „Green’s Distemperoid“ (Green, 1946). Robert Gladding Green isolierte den CDV-Stamm, der zu hohen jährlichen Verlusten in der Silberfuchszucht der Fromm Bros. führte. Green’s Distemperoid war durch 57 Passagen auf Frettchen-Milz-Zellen attenuiert worden (Appel und Gillespie, 1972). Er wurde später unter dem Namen Fromm-D vermarktet und wird bis heute (unter anderem Namen) verwendet (frommhistory.org, 2013). Vergleiche zwischen der Impfung mit „Green’s Distemperoid“ und der „Laidlaw-Dunkin-Methode“ erbrachte eine vergleichbare Zahl von Todesfällen (5 respektive 7%) nach Vakzinierung (Jonas et al., 1947).

In den 1950er Jahren wurde an attenuierten CDV-Stämmen, wie dem avianisierten „Onderstepoort“ (OND), gearbeitet. Bereits 1948 gelang Haig mit seinem nach der Veterinärmedizinischen Fakultät in Pretoria benannten Stamm die erste Avianisierung. Er verwendete „Green’s Distemperoid“ und passagierte das Virus 25-mal auf der Chorioallantoismembran embryonierter Bruteier und konnte bereits eine deutliche Attenuierung im Frettchenmodell beobachten. Nach insgesamt 130 Passagen wurde die sichere Verwendung als Impfstoff für Hunde und Frettchen propagiert (Appel und Gillespie, 1972; Haig et al., 1956) und findet bis heute in den meisten Impfstoffen Verwendung. Viele weitere

attenuierte Stämme, wie „Lederle“, „raccoon9“, „Wisconsin FXNO“ und „Rockborn“ wurden auf ähnliche Weise generiert (Appel und Gillespie, 1972). Letzterer wurde 1952 durch Gunnar Rockborn nach einem schweren Staupeausbruch bei Hunden in Schweden isoliert und mittels 56 Passagen auf Hundenierenzellen attenuiert (Rockborn et al., 1959). Seine Untersuchungen zur Attenuierung fanden, wie damals üblich, im Frettchenmodell statt. Allerdings gibt es wiederholt Berichte, dass der Stamm „Rockborn“ in der Lage ist, seine Virulenz in Hunden wieder zu erlangen (Martella et al., 2011; Cornwell et al., 1988; Metzler et al., 1980; Bestetti et al., 1978; Hartley et al., 1974; Appel et al., 1978). Daher wurde dieser nach 1993 offiziell nicht mehr in kommerziellen Impfstoffen verwendet. Hinweise auf Rockborn oder zumindest Rockborn-ähnliche Stämme wurden jedoch durch neuere Untersuchungen auch in weiterhin zugelassenen Impfstoffen gefunden (Martella et al., 2011).

Der Großteil der bis jetzt verwendeten Impfstämme (OND, Snyder Hill, D84, Lederle) wurde bereits in den 1950er Jahren oder noch früher entwickelt. Durch die Einführung dieser attenuierten Stämme als MLV ist es gelungen, die Verluste in den Hundepopulationen durch Infektionen mit dem Staupevirus drastisch zu reduzieren (Appel et al., 1995).

Nach einer natürlichen Staupevirusinfektion liegt laut Literatur eine lebenslange Immunität vor (Barrett et al., 1999; Appel und Gillespie, 1972). Dass bei korrekter Grundimmunisierung zumindest eine langjährige Immunität vorliegt, konnte durch verschiedene Arbeiten gezeigt werden. Die Werte der bestimmten Antikörper-Titer waren unterschiedlich hoch. Ein bestehender Schutz wurde jedoch für eine Dauer von zwei bis acht Jahren angegebenen (Schulz et al., 2010; Schulz et al., 2006; Böhm et al., 2004; Jozwik et al., 2004; Jozwik et al., 2002).

Trotz dieser positiven Bilanz gibt es auch weiterhin Berichte über ungenügende Immunisierungserfolge (im Sinne von Impfdurchbrüchen) oder von Impferkrankungen bei Hunden. Dabei konnte oft nicht sicher zwischen den beiden Erkrankungsgründen bzw. den auslösenden Erregern unterschieden werden (Simon-Martinez et al., 2008; Jozwik et al., 2004; Jozwik et al., 2002; Gemma et al., 1996; Kai et al., 1993; Bohm et al., 1989; Cornwell et al., 1988; McLaughlin et al., 1985; Appel et al., 1984; Bestetti et al., 1978).

Mögliche durch die Impfstämme ausgelöste Erkrankungen wurden Impfstoffen zugeschrieben, die Viren beinhalten, die auf Hundenierenzellen vermehrt wurden. Den ungefährlicheren avianisierten Stämmen wird dagegen eine geringe Immunogenität nachgesagt (Appel et al., 1995). Dies scheint jedoch speziesspezifisch zu sein, sowohl die Sensitivität des Impflings, als auch die Immunogenität des Impfstoffes betreffend (Halbrooks et al., 1981).

Bei ungenügenden Immunisierungserfolgen muss aber auch an Anwendungsfehler bei der Vakzinierung gedacht werden. Fehlerquellen sind zum Beispiel nicht korrekt rekonstituiertes Lyophilisat, Unterbrechung der Kühlkette, nicht gesicherte Applikation der erforderlichen Menge, Vakzinierung von Impflingen mit maternalen Antikörpern, nicht gesunden oder bereits Staupe-infizierten Tieren, eine vorliegende Immunsuppression durch Kortikosteroide oder ein Vitamin E-Mangel (Povey, 1989). Weiterhin vorliegende maternale Antikörper lassen keine ausreichende Immunität durch eine Impfprophylaxe entstehen und sind ein gut dokumentiertes Problem (Welter et al., 2000; Pare et al., 1999; Chappuis et al., 1995). Außerdem konnten finnische Forscher aufzeigen, dass es starke Unterschiede in der Immunogenität von Lebendimpfstoffen gibt („*low-take*“- und „*high-take*“-Vakzinen). Sie erklären, dass selbst bei möglicherweise ausreichender Impftrate ein Staupeausbruch dadurch ermöglicht wurde, dass die Marktanteile von „*low-take*“ Impfstoffen zu hoch waren (Rikula et al., 2007; Rikula et al., 2000; Ek-Kommonen et al., 1997). In der Tiermedizin werden in aller Regel nicht standardmäßig Impftiter bestimmt, wodurch solche Vorgänge meist nur retrospektiv aufgeklärt werden können.

Ein weiterer immer wieder genannter Grund für mögliche Impfdurchbrüche sind neue virulente Stämme, die nicht genügend durch kreuzneutralisierende Antikörper abgedeckt werden (Lan et al., 2006; Gemma et al., 1996; Kai et al., 1993). Allerdings gibt es hierzu kaum belastbare Daten aus entsprechenden Challenge-Versuchen.

Gerade bei kleinen, genetisch wertvollen Beständen, wie bei vom Aussterben bedrohten Tierarten, ist eine sichere Immunprophylaxe unabdingbar.

Deshalb wurden die letzten bekannten Schwarzfußiltisse 1976 auch geimpft. Leider entwickelten die Tiere daraufhin klinische Symptome und starben (Pearson et al., 1977; Carpenter et al., 1976). Schwarzfußiltisse galten daraufhin von 1976 bis 1981 als ausgestorben, bis doch noch eine Kolonie in Wyoming entdeckt wurde. Diese wurden vorsorglich nicht geimpft und in eine Zuchtanlage verbracht. Dort zeigten sie klinische Symptome. Sie waren an einem Feldstamm erkrankt und nur sechs der Tiere konnten gerettet werden (Williams et al., 1988). Die Population befindet sich aber wieder im Aufbau. Die Tiere werden derzeit mit einem kanarienvogel-basierten, rekombinanten Staupeimpfstoff („Purevax Ferret Distemper“) geschützt (blackfootedferret.org, 2013).

Wie das Beispiel der Schwarzfußiltisse zeigt, sind viele empfängliche Spezies recht empfindlich gegenüber diesen gebräuchlichen Vakzinen. Es wird immer wieder von Impfkomplicationen berichtet, die unter betreuenden Tierärzten für große Unsicherheit im

Umgang mit der Staupeimpfung sorgt. Die nachfolgende Aufstellung (Tabelle 3) listet Fälle von Erkrankungen bei Exoten in der Literatur auf, die durch Impfungen hervorgerufen wurden. Auch hier wurde Wert auf Details gelegt, wie die geführten Nachweise einer Staupeerkrankung bzw. seines Erregers und die verwendeten Impfstoffe, falls angegeben.

Tabelle 3: Impfkomplicationen bei exotischen, empfänglichen Spezies

Erstautor	Jahr	Tierart	Nachweis	Nach Impfung	geimpft
Bush, M.	1976	Kleiner Panda (<i>Ailurus fulgens</i>)	ESK, Patho, klinisch, Virus isoliert und für Frettchen nicht virulent	ja	ja (Enduracell)
Carpenter, J. W.	1976	Schwarzfußiltis (<i>Mustela nigripes</i>)	klinisch, ESK	ja	Ja, nach Fang, Transport & Impfung mit doppelter Dosis (Europäische Frettchen jedoch ohne Probleme)
Davidson, W. R.	1992	Graufuchs (<i>Urocyon cinereoargenteus</i>)	ESK, Patho, Graufuchs erkrankt nach MLV	ja: 2	ja: 2, nur Graufüchse (Rotfüchse o.B.)
Ek-Kommonen, C.	2003	Europäischer Nerz (<i>Mustela lutreola</i>)	ESK, Patho, IFAT	ja (1 von 2)	ja (1 von 2; Distemink)
Gill, J. M.	1988	Frettchen (<i>Mustela putorius furo</i>)	klinisch, ESK, Patho	ja	ja
Halbrooks, R. D.	1981	Graufuchs (<i>Urocyon cinereoargenteus</i>)	klinisch, Neuropatho, IFAT, ESK	ja	ja (Vanguard D, USA; Tissuvax, USA)
Itakura, C.	1979	Großer Panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>)	Originalpaper nur japanisch	ja	ja?
Kazacos, K. R.	1981	Kinkajou (<i>Potos flavus</i>)	klinisch, ESK, Patho, IFAT, Neuropatho	ja	ja (Vanguard, USA)
Loeffler, I. Kati	2007	Großer Panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>), Kleiner Panda (<i>Ailurus fulgens</i>)	klinisch: respiratorisch und Diarrhoe; Zahnschmelzfehler	ja	ja (in China hergestellter 5fach Impfstoff)
McCormick, A.	1983	Afrik. Wildhund (<i>Lycaon pictus</i>)	IFT, ESK, pathologisch	ja	ja
McInnes, E. F.	1992	Waldhund (<i>Speothos venaticus</i>)	klinisch, pathologisch, ESK	ja	ja (DA ₂ MP Vanguard, Südafrika)
Montali, R. J.	1983	Mähnenwolf (<i>Chrysocyon brachyurus</i>), Waldhund (<i>Speothos venaticus</i>), Kleiner Panda (<i>Ailurus fulgens</i>)	alle o.B. (bis auf 1 kl. Panda)	ja	nein (ja, 1 kleiner Panda starb, unklare Ursache; Fromm-D)
Pearson, G. L.	1977	Schwarzfußiltis (<i>Mustela nigripes</i>)	4/6 gestorben	ja	ja (Impfstoff American Scientific Laboratories)
Sutherland-Smith, M. R.	1997	Europäischer Nerz (<i>Mustela lutreola</i>)	klinisch, Patho, ESK, Virusisolierung	ja	ja (Galaxy 6 MPH-L)
Van Heerden, J.	1989	Afrik. Wildhund (<i>Lycaon pictus</i>)	Patho	ja	ja

Derzeit sind in Deutschland 9 verschiedene Impfstoffe bzw. Produktlinien für Hunde und Frettchen zugelassen, die alle auf MLVs beruhen (Vetidata, 2013). Tabelle 4 listet die Impfstoffe und wichtige Details auf, wie die Tierart, für die sie zugelassen sind, den verwendeten Staupe-Stamm (hervorgehoben) und das zur Vermehrung verwendete Wirtszellsystem, sofern angegeben.

Tabelle 4: zugelassene Impfstoffe in Deutschland (Stand: März 2014)

Handelsname (ggf. einfachste Darreichung)	Tierart	1 Dosis enthält	Adjuvans	Wirtssystem	Zulassungsinhaber /Vertreiber
Duramune DAPPi + L	Hunde	Lebendes, attenuiertes canines Staupevirus, Stamm Onderstepoort : > $10^{2,5} - 10^{4,8} \text{ *GKID}_{50}$	Ethylen/Malein- anhydrid (EMA) 0,01 ml, Neocryl A640 (50% Lösung) 0,03 ml	Vero Zelllinie	Pfizer GmbH/Zoetis Deutschland
Enduracell 8	Hunde	Lebendes abgeschwächtes canines Staupevirus, Stamm N-CDV (Stamm Synder Hill) : $10^{3,0} - 10^{5,5}$ GKID50	Aluminium- hydroxid 1,7 - 2,1 mg	Hundenieren- Zelllinie (NL-DK-1)	Pfizer GmbH/Zoetis Deutschland
Eurican SHP	Hunde	Attenuiertes Staupevirus (Stamm BA5): mind. $10^{4,0}$ GKID ₅₀	keine	Vero-Zellen	Merial GmbH
Febrivac Dist	Frettchen & Nerze	Attenuiertes Staupevirus, Stamm D 84/1 $10^{3,7} - 10^{5,2}$ KID ₅₀	keine	SPF- Hühnerembryo- fibroblasten	IDT Biologica GmbH
Nobivac SHP	Hunde	Staupevirus (Stamm Onderstepoort) mind. $10^{4,0}$ GKID ₅₀ *, max. $10^{6,0}$ GKID ₅₀	keine	Vero Zelllinie	Intervet Deutschland GmbH
Rivac SHPPi+3LT	Hunde	Canines Staupevirus; Stamm CDVU 39 : min $10^{3,0}$ GKID ₅₀ *, max $10^{4,7}$ GKID ₅₁	Aluminium- hydroxidgel 1,8 - 2,2 mg	keine Angaben	Ecuphar GmbH
Vanguard 7	Hunde	Lebendes abgeschwächtes canines Staupevirus, Stamm N-CDV (Stamm Synder Hill) : $10^{3,0} - 10^{5,5}$ GKID50	keine Angaben	Hundenieren- Zelllinie (NL-DK-1)	Pfizer GmbH/Zoetis Deutschland
Versican DHPPi	Hunde	Canines Staupevirus; Stamm CDVU 39 : min. $10^{3,0}$ GKID ₅₀ * $10^{4,7}$ GKID ₅₀	keine Angaben	keine Angaben	Pfizer GmbH/Zoetis Deutschland
Virbagen canis SHA/L	Hunde	attenuiertes canines Staupevirus - Stamm Lederle VR 128 $10^3 - 10^5$ GKID ₅₀	keine Angaben	keine Angaben	Virbac Tierarzneimittel GmbH

6.3 *Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) als Plattform einer Vektorvakzine*

MVA (*Modified Vaccinia Virus Ankara*) ist ein über mehr als 570 Passagen auf Hühnerembryofibroblastenzellen attenuierter Vaccinia-Stamm des Genus Orthopocken aus der Familie der *Poxviridae* (Sutter et al., 1992; Mayr et al., 1975; Mayr et al., 1964).

Die Viruspartikel der Orthopockenviren besitzen eine etwa 250nm große, fass- bzw. backsteinförmige Hülle, die unter anderem ein hantelförmiges core, sowie Lateralkörperchen enthält. Das in den Viruspartikeln enthaltene Genom ist ein doppelsträngiges DNA-Molekül von 170 bis 240kbp Größe. Das Genom von MVA umfasst 178kbp und enthält 193 offene Leserahmen, die für 177 Gene kodieren (Antoine et al., 1998).

Variola oder Menschenpocken (*smallpox*) forderten unzählige Millionen Menschenleben, bevor im Jahre 1980 von der WHO die Freiheit von den Pocken verkündet werden konnte (Henderson et al., 2001). Dieser erfolgreichen Eradikation gingen über hundert Jahre staatlich verordneter Impfprogramme voraus. Ermöglicht wurde dies durch die Arbeiten von Edward Jenner, der die damaligen überlieferten Impfpraktiken (aus Indien und China) wissenschaftlich untersuchte und damit den Grundstein für Impfungen im heutigen Sinne legte, wie in seinem Werk „*The Origin of the Vaccine Inoculation*“ von 1801 beschrieben (Gilbert, 2013; Behbehani, 1983).

Die anfangs für die Impfungen verwendeten Viren waren jedoch noch weiterhin in mehreren Spezies vermehrungsfähig und virulent. Daher wurde überall auf der Welt an besser attenuierten Impfstämmen gearbeitet (Gilbert, 2013; Verardi et al., 2012; Paran et al., 2009; Mayr et al., 1975; Stickl et al., 1974).

Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) wurde von Anton Mayr am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre der LMU München (heute: Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen) als Weiterentwicklung des Stammes Chorioallantois Vaccinia Virus Ankara (CVA) in Hühnerembryofibroblastenzellen generiert (Gilbert, 2013; Meisinger-Henschel et al., 2007; Staib et al., 2004; Mayr et al., 1975; Stickl et al., 1974; Mayr et al., 1964). Seine „auffälligste“ Eigenschaft ist das Auftreten von sechs, 24,7kb umfassenden, Deletionen in seinem Genom (Gilbert, 2013; Meisinger-Henschel et al., 2007; Sutter et al., 1992; Meyer et al., 1991). Durch diese ist es zum Verlust einiger Virulenzfaktoren und *host range*-Genen gekommen, wodurch sich MVA sehr gut als verträgliche Impfung bei der Eradikation der *smallpox* einsetzen ließ. Durch den Verlust von ca. 12% des Original-Genoms

(CVA) ist auch ein Risiko der Reversion zu einer virulenten Form minimiert (Price et al., 2013; Meisinger-Henschel et al., 2007; Phelps et al., 2007; Meyer et al., 1991; Mayr et al., 1975; Mayr et al., 1964).

Durch diese genetischen Besonderheiten ergibt sich seine herausragende Stellung als Plattform für rekombinante Vakzinen, da ohne Probleme ebenso viel genetische Information inseriert werden kann, wie über die Deletionen verloren ging (Gilbert, 2013; Brun et al., 2008; Moss et al., 1996; Sutter et al., 1992).

Die Biologische Sicherheit der Impfform MVA ist bei der Anwendung an Säugern durch die Arretierung des Replikationszyklus von MVA in der Morphogenese gegeben (Cottigham et al., 2013; Kremer et al., 2012; Verheust et al., 2012; Drexler et al., 2004; Sancho et al., 2002; Sutter et al., 1992; Drexler et al., 1998), wodurch eine sichere Anwendung, auch im Umgang, wie bei Verimpfung und der Herstellung, gegeben ist.

Die Immunogenität von MVA ist hervorragend (Gilbert, 2013; Draper et al., 2013; Price et al., 2013; Drexler et al., 2004) und erstreckt sich auch auf inserierte rekombinante Gene bzw. die hierdurch exprimierten Proteine (Song et al., 2013; Hessel et al., 2011; Brewoo et al., 2010; Chandran et al., 2010; Stittelaar et al., 2010; Kreijtz et al., 2009; Kreijtz et al., 2007; Bisht et al., 2004; Wang et al., 2004; Sutter et al., 1994).

Dies hat verschiedene Gründe. Zum einen bedient MVA beide Arme des Immunsystems (humoral und zellulär) (Draper et al., 2013; Gilbert, 2013; Kastenmüller et al., 2013; Lambe, 2012; Nörder et al., 2010; Esteban, 2009; Dorrell et al., 2000), sorgt zum zweiten für eine langanhaltende Dauer hoher Level der Proteinexpression (Nörder et al., 2010; Wang et al., 2004) und besitzt zum dritten eine intrinsische Eigenschaft als Adjuvans (Draper et al., 2013; Lambe, 2012; Mayr, 2004).

Damit ist *Modified Vaccinia Virus Ankara* gegenüber anderen Kandidaten für rekombinante Impfstoffe, wie z.B. den Abkömmlingen Kanarien-Pocken oder denen anderer Vaccinia-Stämme, durch seine erzeugte Immunität überlegen (Gilbert, 2013; Draper et al., 2013; Cottigham et al., 2013; Price et al., 2013). Andere Poxvirus-Vektoren kämpfen außerdem mit dem Umstand, dass sich die Immunantwort bei der Boosterung, also einer mindestens zweiten Applikation, vorwiegend gegen die Vektor-Plattform, anstatt gegen die eingebrachten Antigene richtet (Cottigham et al., 2013; Gilbert, 2013; Howles et al., 2010; Ramirez et al., 2000).

Bei Studien mit Abkömmlingen der Kanarien-Pocken konnte kein, über längere Zeit aufrechterhaltener, Antikörpertiter gegen die eingebrachten Antigene gezeigt werden (Draper et

al., 2013; Gilbert, 2013; Quinley et al., 2013; Welter et al., 2000).

Rekombinante Impfstoffe haben im Allgemeinen den großen Vorteil, dass sie nicht in der Lage sind, die Erkrankung auszulösen, gegen deren Erreger geimpft werden soll. Es liegen schließlich keine vermehrungsfähigen Einheiten dieses Erregers vor, sondern nur wichtige immunogene Proteine oder deren Teile (Brun et al., 2008; Pastoret, 1996).

Rekombinante Impfstoffe besitzen gegenüber den MLVs deshalb den entscheidenden Vorteil, dass hier keine Virusausscheidung stattfindet (Quinley et al., 2013). Gerade im Bereich von Zoo- und Wildtieren, in dem oft nicht alle Tiere gleichzeitig impfbar sind oder der Kontakt mit nicht geimpften oder immunsupprimierten Tieren aufgrund räumlicher Vorraussetzungen oder von Sozialstrukturen innerhalb der Gruppe oder der Gemeinschaftshaltung verhindert werden kann, ist dies von großer Bedeutung. Virusausscheidung nach Impfung bzw. die Übertragung und Erkrankung von ungeimpften Kontakttieren wird deshalb bei den wenigen existierenden Impf-Versuchen mit exotischen Spezies untersucht (Kock et al., 2009). Denn es gibt Beispiele in der Literatur, bei denen wahrscheinlich aufgrund der Übertragung der Impfviren von den Impflingen auf ungeimpfte Tiere zu Todesfällen kam (Gill et al., 1988).

Die beste Immunität lässt sich bisher nur mit einer überlebten Staupevirusinfektion erreichen. Die nächstbeste Variante ist die Impfung mit modifizierten Lebendimpfstoffen. Hierbei ist jedoch, wenn auch mit einem weitaus geringeren Risiko, mit einer Mortalität aufgrund der Impfung zu rechnen. Dies ist durch die weiterhin bestehende Vermehrung der attenuierten Viren im Impfling und die damit einhergehenden Leukopenie bedingt. Diese Leukopenie ist unterschiedlich ausgeprägt, bedeutet aber immer ein Risiko für Sekundärinfektionen, die fatal sein können (Montali et al., 1983).

Ein weiterer großer Vorteil gegenüber *Modified-live vaccines* (MLV) ist die gute Thermostabilität, wodurch eine gute Haltbarkeit der Impfdosen, auch in heißen Regionen der Welt, und eine Verminderung von Anwendungsfehlern bei der Vakzinierung erzielt werden kann (Verardi et al., 2012; Chandran et al., 2010; Verardi et al., 2002; Pastoret, 1996).

Außerdem lassen sie sich sehr gut als Marker- oder DIVA-Impfstoff (*Differentiating Vaccinated from Infected Animals*) einsetzen, da beim korrekt geimpften Tier Antikörper gegen das rekombinante Virus (MVA-Staupegen-Rekombinante) selbst (Positivmarker) und das inserierte Antigen nachweisbar sind, aber natürlich nicht gegen alle anderen Antigene (Negativmarker) des ätiologischen Agens der Erkrankung, gegen die die Immunprophylaxe durchgeführt wird (Chandran et al., 2010). Im Rahmen der Staupediagnostik stellt das abundant

gebildete, stark konservierte Nukleokapsid üblicherweise den Ansatzpunkt der Diagnostik dar und wäre bei mit rekombinantem Virus geimpften Tieren nicht nachweisbar (Elia et al., 2006).

Bereits Anfang der '90er Jahre des letzten Jahrhunderts wurden experimentelle Impfstoffe auf Vaccinia-Basis gegen Staupe erstellt und bereits erfolgreich getestet (Wild et al., 1993; Taylor et al., 1991). Das Vaccinia Virus ist jedoch als in Säugern weiterhin replikationsfähiger Vektor nicht ohne weiteres einsetzbar. So gab es bei der Anwendung von Vaccinia bei der Eradikation der *smallpox* eine nicht unerhebliche Zahl an schweren Nebenwirkungen (bei einer aus 500.000 immunkompetenten Individuen, wobei die Zahl bei immungeschwächten noch um einiges höher lag) (Stittelaar et al., 2001).

Vaccinia ist als Vektor für Impfkampagnen gegen Tollwut bei Wildtieren jedoch deshalb mit Erfolg eingesetzt worden, weil das Virus, das die Information für das G-Protein des Tollwutvirus trägt, nach der Aufnahme des Köders durch Säuger in der Lage war, aufgrund seiner Replikation im Impfling eine gute Immunität zu induzieren (Pastoret, 1996). Eine gewisse Replikation war also nötig, um, auch nach längerer Verweildauer zwischen Abwurf der Köder und Aufnahme durch den Impfling, eine ausreichende Antigen-Menge garantieren zu können. Das bedeutet aber auch, dass es nötig ist, erhöhte Vorsicht beim Umgang mit den Impfviren bzw. den Ködern walten zu lassen, wie Unfälle mit den Impfködern deutlich zeigen (CDC, 2009). Eine Anwendung in ausgebrachten Ködern mit MVA oder Kanarienvaccinia als Vektorimpfstoffbasis wäre vor dem Hintergrund der nicht gegebenen Vermehrungsfähigkeit in Säugerzellen dementsprechend nicht zielführend (Weyer et al., 2007).

MVA ist durch seine außerordentlichen Eigenschaften selbst in immunsupprimierten Individuen (Stittelaar et al., 2001) gut verträglich und wird deshalb in der Humanmedizin auch in der Erprobung als Vakzineplattform gegen AIDS eingesetzt (Esteban et al., 2009). Impfstoffe auf MVA-Basis gegen Krebs (Harrop et al., 2013; Said et al., 2013) und HIV (Bakari et al., 2011; Currier et al., 2010; Howles et al., 2010) befinden sich bereits in klinischen Studien.

7 Zielsetzung dieser Arbeit

In Deutschland gibt es eine Vielzahl verschiedener Impfstoffe gegen Staupe, von denen nur ein einziger für andere Tierarten als Hunde zugelassen ist („FebriVac Dist“, IDT; zugelassen für Frettchen und Nerze) (Vetidata, 2013). Dieser ist jedoch, wie der Pharmakovigilanzreport 2011

der Deutschen Bundestierärztekammer zeigte, selbst bei der Spezies, für die er zugelassen ist, nicht immer sicher anwendbar (ein sicher dokumentierter Todesfall aufgrund der Impfung) (Hoffmann et al., 2012).

Eine große Zahl verschiedener Spezies ist empfänglich für Staupe und oft recht empfindlich gegenüber der Restvirulenz von CDV-Stämmen in zugelassenen Impfstoffen, weshalb in vielen Zoologischen Einrichtungen mit dem Einsatz von Vakzinen gezögert wird (Müller et al., 2011).

Der Eintrag in nicht ausreichend immunisierte Bestände ist aufgrund von mitunter recht hoher Staupe-Prävalenz in Wildtierbeständen eine ständige Gefahr (Denzin et al., 2013). Eine Therapie der Erkrankung ist jedoch bisher keinesfalls kausal, sondern weiterhin bestenfalls unterstützend bzw. symptomatisch möglich.

Damit ergibt sich deutlich, wie schwerwiegend der prophylaktische Notstand aller betreuenden Tierärzte von Zoologischen Einrichtungen und Tierparks, sowie für Halter und Züchter exotischer Tiere bzw. eben auch hier der betreuenden Tierärzte ist. Ein Impfschutz dieser Tiere ist jedoch gerade im Hinblick auf den Artenschutz von größter Bedeutung. In Einrichtungen, die sich dem Schutz und der Zucht bedrohter Tierarten verschrieben haben, sollte eine bestmögliche Prophylaxe verfügbar sein. Als eindrucksvolles Beispiel für dieses Dilemma können hier die Pandas im Tiergarten Schönbrunn, Wien gelten, die bisher nicht gegen Staupe geimpft werden (mündliche Kommunikation), obwohl sonst weder Kosten noch Mühen gescheut werden.

Wie unter Punkt 5 Epidemiologie veranschaulicht, kann der Kontakt empfänglicher Spezies mit potentiellen Überträgern in der Regel nicht vollständig verhindert werden, so dass eine Vermeidung von Staupeausbrüchen nur durch eine belastungsfähige Immunprophylaxe der betreffenden Bestände erreicht werden kann.

Deshalb sollen im Rahmen dieser Arbeit Expressionsstudien zu verschiedenen Staupe-Proteinen durch MVA durchgeführt werden, um erste Erkenntnisse für die Erstellung von sicheren und zuverlässig schützenden Impfstoffkandidaten gegen Staupe für den Einsatz bei einer größtmöglichen Anzahl Spezies zu gewinnen.

Die Oberflächenantigene H und F des Staupevirus sind dabei eine leicht nachvollziehbare und keine neue Wahl. Das Einbeziehen des Matrix-Proteins in die Bemühungen um Vakzine-Kandidaten mag nicht so offensichtlich begründet scheinen, jedoch wurde es bereits erfolgreich zur Verstärkung der vermittelten Immunität eingesetzt (Mahapatra et al., 2006).

III. MATERIAL UND METHODEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei rekombinante MVA (MVA-cdvM, MVA-cdvF, MVA-cdvFH) erstellt, die in infizierten Zellen das Matrixgen (MVA-cdvM), das Fusionsgen (MVA-cdvF) oder gemeinsam das Fusions- und Hämagglutiningen (MVA-cdvFH) des Staupevirus synthetisieren.

Zur Erstellung und Charakterisierung eines rekombinanten MVA sind prinzipiell folgende Schritte notwendig:

1. Bereitstellung des *gene of interest* (GOI)
2. Insertion des GOI in ein MVA-Vektorplasmid
3. Transfektion von Zellen mit dem Vektorplasmid und Infektion dieser mit MVA als Grundlage für die homologe Rekombination
4. Isolation von rekombinanten MVA durch Plaqueaufreinigung
5. Charakterisierung der Expression des GOI mittels Western Blots
6. Untersuchung der genetischen Stabilität
7. Charakterisierung der Replikation des rekombinanten MVA

Bei der Erstellung der drei Rekombinanten wurden bei der Bereitstellung des *gene of interest* (GOI) und der Insertion dessen in ein MVA-Vektorplasmid verschiedene Wege beschritten, deswegen hier ein orientierender Überblick:

Ad 1: Für die Erstellung des MVA-cdvF und des MVA-cdvFH standen Plasmide zur Verfügung (bereit gestellt von Prof. Riccardo Wittek), die die entsprechenden Gene des CDV-Isolats A75-17 (Cherpillod et al., 2000) beinhalten. In beiden Fällen wurden die GOI mittels PCR aus den Plasmiden amplifiziert und gleichzeitig mit Schnittstellen für den Verdau mit Restriktionsendonukleasen (RE) versehen, sowie im Falle des F-Gens die MVA-Promotersequenz pE3L eingefügt.

Für das MVA-cdvM wurde durch *Alignment* von 18 cdvM-Gen-Sequenzen aus der NCBI-Nukleotid-Datenbank (National Center for Biotechnology Information) eine Konsensus-Sequenz erstellt, diese durch stille Mutation so modifiziert, dass MVA-Stopp-Signale (wie TTTTNT) entfernt wurden, mit Erkennungssequenzen für RE versehen und durch GeneArt (Regensburg) synthetisiert.

Ad 2: Die Sequenz des cdvF-Gens wurde nach RE-Verdau einzeln oder gemeinsam mit dem cdvH-Gen in das Vektorplasmid pMKIII H5 red cherry eingesetzt, welches zu einer homologen Rekombination und Insertion des GOI im Bereich der MVA-Deletionsstelle III führt. Das synthetisierte cdvM-Gen wurde in das MVA-Vektorplasmid pLW-73 eingesetzt. Dadurch wurde die Insertion des M-Gens im Bereich zwischen den für MVA essentiellen Genen I8R und G1L des MVA-Genoms möglich.

Ad3: Bei der Transfektion/Infektion wurden zuerst permissive Zellen (DF-1) mit einem MVA-Virus infiziert. Das Virus für die Infektion im Hinblick auf das MVA-cdvM war MVA-F6, also ein Virus ohne Reporter. Für die Erstellung von MVA-cdvF und MVA-cdvFH wurde jeweils das Virus GFP-MVA eingesetzt, welches GFP (*green fluorescent protein*) exprimiert. Während der Inkubation wurde das Transfektionsreagenz mit dem jeweiligen Vektorplasmid gemischt, um eine Emulsion aus DNA-haltigen Lipidtröpfchen zu erhalten. Das Vektorplasmid für die Generierung von MVA-cdvM war das pLW-73_cdvM, für MVA-cdvF das pMKIII H5 red cherry-cdvF und das für MVA-cdvFH das Plasmid pMKIII H5 red cherry-cdvFH. Dieses Transfektionsgemisch wurde nun tropfenweise dem Inokulat auf den Zellen der 6-Loch-Platten zugegeben.

Ad 4: Die Aufreinigung der rekombinanten MVAs wurde nun über das sogenannte *Plaque-Picking* durchgeführt. Bei den Rekombinanten MVA-cdvF und MVA-cdvFH wurde dieser Vorgang durch den grünen Reporter im Wildtyp-MVA erleichtert. Zellen, die unter dem Fluoreszenzmikroskop grün leuchteten, waren nur mit GFP-MVA infiziert, während nur rot leuchtende Zellen nur die Rekombinante enthielten. Oft jedoch war eine Mischinfektion zu beobachten, was eine Isolierung der Rekombinante durch optische Selektion und multiples Passagieren nötig machte. Der Vorgang war bei MVA-cdvM ähnlich, ohne die Möglichkeit jedoch eine Infektion bzw. eine Mischinfektion mit dem Wildtyp-MVA zu erkennen. Eine Kontrolle konnte nur auf dem Wege der PCR (Wildtyp-PCR) erfolgen, bei der die Primer an den *flanking regions* binden und somit entweder die leere Insertionsstelle oder diese mitsamt Insert amplifizieren, wodurch der sogenannte *shift*, also eine Verschiebung der Bandengröße im Gelbild beobachtet werden kann. Diese Wildtyp-PCRs wurden bei den anderen beiden Konstrukten (MVA-cdvF und MVA-cdvFH) auch durchgeführt, da die PCR eine höhere Sensitivität besitzt, als das optische Selektionsverfahren. Außerdem wurden verschiedene PCRs zur Sicherstellung des korrekten Inserts vorgenommen.

Ad 5: Mit dem Stamm S15 durchgeführte Infektionsversuche und anschließende Western Blots zeigten, dass die Probenentnahme für den Nachweis der Staupeproteine unterschiedlich

gehandhabt werden musste. So wurde der Nachweis des rekombinanten cdvM über das Zellpellet der infizierten Zellen geführt, während der Nachweis der beiden Glykoproteine mittels lysierten Zellen erfolgte.

Die Durchführung der Western Blots folgte bei allen Konstrukten demselben Protokoll. Naturgemäß wurden jedoch verschiedene Primärantikörper verwendet, beim Nachweis des cdvF fand jedoch außerdem ein Protein A-HRP Konjugat als Sekundärantikörper Anwendung.

Ad 6: Die genetische Stabilität der Rekombinanten wurde durch fünf „niedrig-MOI-Passagen“ (*multiplicity of infection*) und die anschließende erneute Kontrolle der Viren durch die bereits erwähnten PCR-Schritte und Nachweise der Proteinexpression untersucht.

Ad 7: Für die Charakterisierung der Replikation dieser neu generierten Viren wurden permissive (DF-1- und CEF-Zellen), sowie nicht permissive Zellen infiziert und zu bestimmten Zeitpunkten danach geerntet. Diese Proben wurden anschließend in Mehrfach-Ansätzen titriert, also deren Viruskonzentration bestimmt. Die resultierenden Werte wurden vergleichend aufgetragen, um zum einen in permissiven Zellen eine unbeeinträchtigte Replikation gegenüber dem Wildtyp-Virus aufzuzeigen und zum zweiten in nicht permissiven Zellen die weiterhin bestehende biologische Sicherheit bei der Anwendung an Säugern festzustellen.

Nach diesem Überblick werden nun die einzelnen Schritte genauer vorgestellt.

Alle Angaben zu den Herstellern der verwendeten Materialien, der verwendeten Geräte und Software befinden sich im Übrigen im Anhang.

1 Alignment

Bei einem *Alignment* werden DNA- oder Proteinsequenzen entweder paarweise oder multipel miteinander verglichen, um Homologien oder Heterologien, sowie deren Ausmaß zu bestimmen. Außerdem ist es möglich, Konservierungsmuster und Variabilität zu erfassen, sowie evolutorische Beziehungen zu rekonstruieren.

Der zumeist und auch hier verwendete Algorithmus nennt sich „ClustalW“ (in den Programmen MegAlign und MEGA5 (Kumar2008, Tamura2007)).

Alignments dienen hier der Erkennung von Mustern, also ähnlichen Sequenzabschnitten, z.B. für das Legen von Primern und der Erstellung der Konsensus-Sequenz für MVA-cdvM, oder unterschiedlichen Bereichen, z.B. zur Suche nach Mutationen (wie bei der ersten

Sequenzierung der Gene F & H nach der Insertion in das Vektorplasmid und dem Vergleich mit der Referenzsequenz aus der Nukleotid-Datenbank).

2 Sequenzkontrolle

Bei der Sequenzkontrolle wird primär auf die Güte der durchgeführten Sequenzierung anhand der QV-Werte (*Quality Value*) geachtet, die in den .ab1-files enthalten sind. Denn ergeben sich bei *Alignments* mit Referenzsequenzen fragliche Mutationen, sind diese Positionen in jedem Falle zuerst im Sequence Scanner auf mögliche unsaubere *peaks* zu untersuchen. Sind Mutationen auch dann nicht zweifelsfrei zu erkennen oder auszuschließen, sollte eine weitere Sequenzierung der ROI (*region of interest*) durchgeführt werden.

3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der PCR werden bekanntermaßen DNA-Abschnitte in vitro mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase vervielfältigt.

Für die Herstellung von PCR-Produkten, die für weitere wichtige Schritte (weitere Konstruktionsschritte oder anschließende Sequenzierung) verwendet wurden, wurden *proof-reading* DNA-Polymerasen (Pfx50 DNA Polymerase & Q5 High-Fidelity DNA Polymerase; siehe Tabelle 5) verwendet, um hierbei möglichst Fehler zu vermeiden.

Tabelle 5: Polymerasen

Bezeichnung	Bezugsquelle
Pfx50 DNA Polymerase	Invitrogen, Darmstadt
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
Taq DNA Polymerase, recombinant	Invitrogen, Darmstadt

Folgende MasterMix-Rezepte (Tabelle 6) wurden für die verschiedenen Ansätze gemäß den Anforderungen der Polymerasen verwendet. Dabei wurde strikt auf die Einhaltung getrennter Räumlichkeiten (DNA-Reinraum) geachtet, um die Gefahr von Verunreinigungen der Primer und anderer PCR-Komponenten zu minimieren.

Tabelle 6: Schema Mastermixe

<u>Pfx50</u>	<u>Q5</u>	<u>Taq (Rec Invitrogen)</u>	
19,8	15,8	19,2	Aqua demin
2,5	5	2,5	Puffer
0,5	0,5	0,5	dNTP
0,2	0,2	0,1	Polymerase
0	0	0,7	MgCl ₂
0,5	1,25	0,5	Primer F
0,5	1,25	0,5	Primer R
1	1	1	Template
25	25	25	

4 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegel-Elektrophorese

Elektrophorese bezeichnet eine Methode zur Auftrennung von Molekülen aufgrund ihrer unterschiedlichen Größen und Ladungen beim Wandern durch ein elektrisches Feld.

Es wurden auf den Gelen jeweils flankierend kommerziell verfügbare DNA-Größenstandards (Quick-Load 1 kb DNA Ladder oder Quick-Load 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb)) entsprechend der zu erwartenden Banden aufgetragen. Die Gele, die stets bei 50V gefahren wurden, brauchten bei der zur Verfügung stehenden Trennstrecke für eine gute Auflösung 75 Minuten.

Zur Darstellung der DNA-Fragmente im Gel wurde „Gel Red“ eingesetzt, eine spezielle Färbelösung, die sich wie Ethidiumbromid interkalierend in die Helixstruktur der DNA einlagert. „Gel Red“ wurde hier nach dem Lauf des Gels als „Färbebad“ (in Kochsalzlösung verdünnt) verwendet. Das Bad war bei korrekter Lagerung (im Dunklen) mehrere Monate haltbar. Das „Nachfärben“ im „Färbebad“ ergab eine klare Bänderung, die durch Anregung im UV Licht sichtbar wurde. Die erste optische und die digitale Dokumentation erfolgte mittels ChemiDoc MP System von BioRad.

5 DNA-Extraktion aus dem Agarose-Gel

Nach kurzer optischer Kontrolle unter schwachem UV-Licht wurden die selektierten DNA-Banden aus dem Agarosegel mit einem Skalpell ausgeschnitten und in leere, beschriftete Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Das Gewicht der ausgeschnittenen Gelstückchen wurde bestimmt und die DNA anschließend mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers isoliert.

6 Transformation kompetenter Bakterien

Bei der Transformation wird Plasmid-DNA in die Bakterienzelle eingeschleust und kann auf diesem Wege mit den sich teilenden Bakterien amplifiziert werden.

Zur Amplifikation der verschiedenen Plasmide wurden chemisch kompetente *E. coli*-Stämme (5-alpha Competent *E.coli* (High Efficiency) und 10-beta Competent *E.coli* (High Efficiency), beide New England Biolabs) verwendet.

Die Transfektionen innerhalb dieser Arbeit wurden nach dem Protokoll der New England Biolabs mit Hilfe der Hitzeschockmethode, bei der die Zellwände der K12-*E.colis* bei 42°C kurzzeitig permeabel werden, durchgeführt.

Dazu wurden pro Aliquot von 50 µl kompetenten Bakterien ca. 1ng der Plasmid-DNA bzw. 10µl des Ligationsansatzes hinzupipettiert und mit der Spitze umgerührt. Bei der Transformation von Ligationsansätzen wurde grundsätzlich außerdem ein Aliquot mit leerem Kontroll-Ligationsansatz transformiert, der aus dem Ligationsansatz ohne geschnittenes Insert bestand. Damit wurde die Ligationseffizienz abgeschätzt, wodurch die Anzahl der zu pickenden Bakterienklone festgelegt wurde.

Die Zugabe des mitgelieferten SOC-Mediums markiert die Vorinkubation, also eine Voranreicherung vor der Selektion auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten.

Tabelle 7: Plasmide, deren Spezifikationen und Herkunft

Bezeichnung	Wichtige Komponenten des Aufbaus	Herkunft
pCI-F	In das Plasmid pCI Mammalian Expression Vector der Firma Promega wurde das Glykoprotein F des Staupestammes A75/17 inseriert	Cherpillod et al., 2000
pCI-H	In das Plasmid pCI Mammalian Expression Vector der Firma Promega wurde das Glykoprotein H des Staupestammes A75/17 inseriert	Cherpillod et al., 2000
pMKIII H5 red cherry	Ausgangsplasmid der Klonierung der Staupegen-Plasmide in diesem Institut; es enthält bereits das Reportergen mCherry und den MVA-Promotor PmH5	Melanie Kremer
pMKIII H5 red cherry-cdvF	In das Plasmid pMKIII red cherry wurde das Glykoprotein F des Staupestammes A75/17 über eine PCR aus dem pCI-F entnommen und mittels <i>NotI</i> und <i>PmeI</i> inseriert	diese Arbeit
pMKIII H5 red cherry-cdvFH	In das Plasmid pMKIII red cherry-cdvH wurde das Glykoprotein F des Staupestammes A75/17, welches zuvor aus pMKIII red cherry-cdvF mittels <i>NotI</i> und <i>PmeI</i> herausgeschnitten wurde, inseriert	diese Arbeit
pLW73	dieses shuttle Plasmid erlaubt es Gene zwischen die beiden essentiellen Vaccinia Gene I8L & G1L einzubringen	Linda Wyatt et al., 2009
cdvMgeneCON_ pMA-T	Standardplasmid zur Produktvermehrung nach Synthetisierung mit cdvM-Insert	GeneArt, 2010
pLW-73_cdvM	In das Plasmid pLW73 wurde das Staupeprotein M, welches durch GeneArt synthetisiert worden war, mittels <i>Ascl</i> und <i>PmeI</i> aus dem pCont-cdvM herausgeschnitten und mittels blunting inseriert	diese Arbeit

7 Kultivierung von kompetenten Bakterien

Die bereits erwähnte Selektion auf LB-Ampicillin-Agarplatten erfolgte über nacht im Brutschrank bei 37°C. Hiernach schloss sich das Picken der Bakterienklone an. Handelte es sich um eine sogenannte Re-Transformation, die ausschließlich der Gewinnung von mehr Plasmid-DNA diente, war es ausreichend, sehr wenige Klone für die Weiterkultivierung zu picken. Bei der Transformation von Ligationsansätzen wurde, wie bereits im letzten Absatz erwähnt, grundsätzlich auch leerer Kontroll-Ligationsansatz transformiert. Dadurch war nach der O/N-Inkubation ein Verhältnis der angewachsenen Bakterienklone auf den Ligations- und den Kontrollplatten zu erkennen. Bei einem kleinen Verhältnis, also einer großen Anzahl von Klonen auf der Platte mit Ligationsansatz gegenüber einer kleinen Anzahl von Klonen auf der Kontrollplatte reichte es aus, ca. zehn Klone zu picken. Andernfalls ergab sich die Notwendigkeit, mehr Klone zu picken oder sogar die Transformation sogleich zu wiederholen.

Beim Picken der Bakterienklone wurden sterile Pipettenspitzen mit einer zuvor abgeflammt Pinzette ergriffen. Dann wurden einzeln gelegene, mittelgroße Klone aus der Agarplatte ausgestochen. Die Pipettenspitzen wurden in vorbereitete sterile Reagenzgläser mit jeweils drei Milliliter flüssigen LB-Mediums mit 50mg/l Ampicillin gegeben.

Die nachfolgende Kultivierung der gepickten Bakterienklone erfolgte je nach gewünschter Plasmidmenge (Mini-, Midi- oder Maxi-Präparation) 4 bis 12 Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator (1000 U/Min.). Bei einer folgenden Mini-Präparation war die zu erwartende Plasmidmenge groß genug, andernfalls war dieser Kultivierungsschritt im Reagenzglas eine Vorinkubation vor der über Nacht geschehenden weiteren Kultivierung in Erlenmeyerkolben mit Schikane.

Hierbei wurden je nach nachfolgender Präparationsgröße Flüssigkulturen von 100ml bis 500ml mit ein bis zwei Millilitern der Vorkultur angeimpft und erneut 12-16 Stunden bei 37°C auf dem Schüttelinkubator kultiviert.

Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation der Flüssigkulturen. Das erhaltene Bakterienpellet wurde für die Präparation der Plasmid-DNA mittels kommerziell erhältlicher Kits (siehe Tabelle 17: erworbenes Material im Anhang) nach Herstellerangaben verwendet.

8 Nukleinsäure-Präparation

Die Extraktion von PCR-Produkten aus Agarosegelen, die Präparation von DNAs infizierter Zellkulturen zur Kontrolle der Viren-DNA von MVAs oder die Gewinnung von RNAs aus Staupe-infizierten Kulturen wurde mittels kommerziell erhältlicher Kits (siehe Tabelle 17: erworbenes Material im Anhang) nach Herstellerangaben durchgeführt.

9 Qualitätskontrolle isolierter DNA

Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurde der NanoDrop 1000 benutzt, der eine spektralphotometrische Messung durchführt. Die dadurch erzielte Absorptionskurve zeigt die Reinheit der DNA oder gibt Hinweise auf etwaige Verunreinigungen und deren Quelle. Dabei ist nur ein Volumen von zwei Mikrolitern der gelösten DNA notwendig. Das Gerät ermittelt automatisch die Werte der, für die Reinheit

wichtigen Verhältnisse 260/280 und 260/230 und die Konzentration in ng/μl. Der Bereich, in dem das Gerät akkurat zu messen vermag, liegt zwischen Konzentrationen von 2 und 3700ng/μ.

10 Restriktionsverdau

Plasmide und PCR-Produkte, die in Restriktionsverdauen geschnitten werden sollten, waren allesamt „säulen- bzw. gel-aufgereinigt“. Das heißt entweder waren die DNAs aus einem Agarosegel ausgeschnitten und dann über kommerziell erhältliche Kits extrahiert oder als Zwischenschritt vor einer weiteren enzymatischen Reaktion über die Säulchen eines solchen aufgereinigt. Dies konnte zum Beispiel beim Schneiden mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen der Fall sein. Tabelle 8 listet die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme auf.

Tabelle 8: Restriktionsendonukleasen

Bezeichnung	Erkennungssequenz
<i>Acc65I</i>	G`GTACC CCATG,G
<i>Ascl</i>	GG`CGCGCC CCGCGC,GG
<i>BamHI</i>	G`GATCC CCTAG,G
<i>HindIII</i>	A`AGCTT TTCGA,A
<i>NotI</i>	GC`GGCCGC CGCCGG,CG
<i>PmeI</i>	GTTT`AAAC CAAA,TTTG
<i>Sall</i>	G`TCGAC CAGCT,G
<i>SmaI</i>	CCC`GGG GGG,CCC

Für das Schneiden im Zuge von Klonierungen wurden ausschließlich Restriktionsenzyme der Firma NEB verwendet, die alle im selben Puffer sehr gute Effizienzen erreichten.

Abhängig von der Zielsetzung des Restriktionsverdaues, also zur Durchführung eines Kontrollverdaues nach einer Klonierung oder zur Herstellung von Ausgangsmaterialien für Klonierungen, erfolgte der Verdau in einem Gesamtvolumen von 20 respektive 100µl.

Die Ansätze für die Restriktionsverdaue, sowie die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

11 Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierungsreaktion (das sogenannte „Zippen“) soll die Re-Ligation von linearsierter DNA des Plasmidvektors verhindern. Durch die Abspaltung der endständigen Phosphatgruppen wird das Risiko vermindert, dass es zu einem Wiederverschließen des Vektors ohne den vorherigen Einbau des Inserts kommt. Die erforderlichen Phosphatgruppen für eine Ligation bringt das Insert in die Ligationsreaktion ein.

Zur Dephosphorylierung wurde die Antarctic Phosphatase der Firma New England Biolabs entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

12 Ligationsansatz

Ligationsreaktionen dienen zur kovalenten Verknüpfung von Fragmenten doppelsträngiger DNA unter Verwendung des Enzyms DNA-Ligase des Bakteriophagen T4. Diese Methode wurde zur Einklonierung von viraler bzw. rekombinanter DNA (Insert) in Plasmid-Vektoren (Vektor) verwendet.

Das Gesamtvolumen einer Ligationsreaktion lag stets bei 20µl. Die eingestzten Mengen wurden nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{ng Insert} = ((\text{ng Vektor} \times \text{bp Insert}) / \text{bp Vektor}) \times \text{Verhältnis}$$

Das Verhältnis der Menge Insert-DNA zu Vektor DNA hängt von den Größenverhältnissen zwischen Insert und Vektor ab und war hier 1:3. Als feste Ausgangsgröße wurden 50ng Vektor verwandt. Die Konzentrationen der DNA-Lösungen von Insert und Vektor wurden mit dem NanoDrop 1000 gemessen und dementsprechend die in der Ligationsreaktion einzusetzenden Volumina berechnet. Um die Effizienz der Ligation abschätzen zu können wurden stets zwei Ansätze ligiert. Ein Ansatz enthielt Insert, der zweite nicht. Die Inkubation des

Ligationsansatzes erfolgte für vier bis zwölf Stunden bei RT, dann O/N bei 16°C und anschließend erneut für vier Stunden bei 4°C. Im nächsten Schritt wurde der gesamte Ligationsansatz, wie oben beschrieben, in kompetente Bakterien transformiert.

13 Gewinnung und Kultivierung primärer Zellen

Zur Gewinnung von Hühnerembryofibroblasten (*chicken embryo fibroblasts*, CEF) nach Kremer et al., 2012 wurden SPF-Eier (Valo, Lohmann Tierzucht) 11 Tage bebrütet. Anschließend wurden die Embryonen vorsichtig aus dem Ei präpariert, der Kopf, Beine, Flügel und innere Organe wurden entfernt und der Korpus homogenisiert, indem dieser durch den Konus einer 10ml-Spritze gepresst wurde. Durch wiederholte Behandlung mit Trypsin wurden die Zellen vereinzelt und danach abfiltriert. Die Kultur der CEF-Zellen erfolgte wie unter Punkt 14 beschrieben.

14 Kultivierung und Passagierung von Zellkulturen

Kommerzielle Zellkulturmedien wurden mit HEPES (1%), NEA (1%) und Penicillin/Streptomycin (1%) supplementiert. Bei Glutamin-armen Medien wurde dies ebenfalls zugesetzt (1%). Zur Anzucht von Zellen wurden den Medien 10% und zur Erhaltung 2% FKS zugegeben. Medien für Infektionsversuche waren FKS-frei.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen (siehe Tabelle 9) wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Passagierung erfolgte abhängig von der Zellart in verschiedenen Teilungsverhältnissen und Zeitabständen.

Tabelle 9: Zellen

Bezeichnung	Medium	Zellsplitting	Herkunft
CEF	DMEM, 10% FKS	1:10, alle 2 Tage	eigene Präparation, siehe III. 13
DF-1	DMEM, 10% FKS	1:10, alle 2 Tage	ATCC CRL-12203
HaCat	DMEM, 10% FKS	1:10, alle 2 Tage	DKFZ
VeroDST (Vero.DogSLAMtag)	DMEM, 10% FKS; jede 10. Passage: G418 c=400mg/ml	1:20, alle 3-5 Tage	Seki et al., 2003

15 Infektion von Zellen mit MVA-Viren

Als Saatmaterial wurden virushaltige Zellkultursuspensionen verwendet. Diese wurden einem dreifachen Gefrier-Auftau-Zyklus unterzogen, um alle virushaltigen Zellen zu öffnen. Anschließend erfolgte zur Vereinzelung der Viruspartikel eine Ultraschallbehandlung (Sonopuls, Bandelin electronic). Das Material wurde im Eiswasserbad dreimal für jeweils 60 Sekunden bei maximaler Leistung behandelt. Zwischen den Durchgängen erfolgte eine intensive Durchmischung mit Hilfe eines Vortex. Zur Infektion wurde das Kultivierungsmedium vom Zellmonolayer entfernt und das Virus in der benötigten Konzentration mit dem Infektionsmedium aufgebracht. Das Volumen des Infektionsmediums wurde so gewählt, dass der Zellmonolayer vollständig bedeckt war und eine Austrocknung während der anschließenden Inkubation bei 37°C für 60 Minuten im Brutschrank vermieden werden konnte. Nach der Virusadsorption wurden dem Zellkultursystem entsprechende Mengen an Kultivierungsmedium zugegeben. Die infizierten Zellkulturen wurden täglich auf das Auftreten eines zytopathischen Effektes (Veränderung der Zellmorphologie, ZpE) überprüft.

16 Infektion von Zellen mit Staupe-Viren

Zur Anzucht von CDV wurde eine Simultaninfektion durchgeführt. Frisch geteilte, noch in Suspension befindliche VeroDogSLAMtag-Zellen (VeroDST) wurden dafür mit möglichst hochtitriger CDV-Suspension beimpft. Nach wenigen Stunden wurde Erhaltungsmedium entsprechend der Größe des Zellkultursystems ergänzt. Der ZpE konnte dann meist nach zwei Tagen p.i. am Lichtmikroskop beurteilt werden.

Alle in dieser Arbeit genannten Viren (bis auf generierte Rekombinanten) sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Viren

Bezeichnung	Wichtige Anteile des Aufbaus & Verwendung	Herkunft
MVA p583	Wildtypvirus ohne Reportergene zur Erstellung von MVA-cdvM	Gerd Sutter
MVA p584	Wildtypvirus, welches eine Vermehrungspassage durchlief, um als Kontrolle für Western Blots, aber auch als Ausgangsmaterial für KontrollPCRs zu dienen	diese Arbeit
MVA-GFP p5	Ausgangsvirus für die Erstellung der MVA-cdvF und MVA-cdvFH, das GFP als Reportergen enthält	Gerd Sutter
S15	cdv-Feldisolat (Wirt: Hund)	Institut für Infektionsmedizin & Zoonosen

17 Generierung rekombinanter MVA-Viren

Die Generierung rekombinanter MVA-Viren erfolgt mittels homologer Rekombination. Dabei rekombinieren homologe Sequenzbereiche des verwandten, dahingehend designten Vektorplasmids mit entsprechenden Bereichen im MVA-Genom. Diese Sequenzabschnitte werden im Plasmid, wie auch im MVA-Genom aufgrund ihrer Lage zum Insert als *flanking regions* bezeichnet (siehe Abb. 10). Die Selektion der rekombinanten Viren durch Sichtung der virusinfizierten Zellen (Klone) und die Diskriminierung mittels fluoreszierender Reportergene, sowie die Aufreinigung durch *plaque picking* wird unter Punkt 18 erläutert.

Das Ausgangsmaterial für einen solchen, homologe Rekombination (HR) oder auch Transfektion/Infektion genannten, Schritt ist ein ausreichend hoch konzentriertes aufgereinigtes Vektorplasmid und natürlich ein ebenso reiner, konzentrierter Stock des Ausgangs- oder Wildtyp-Virus.

Für eine HR wurden zuerst konfluente wells von 6-Loch-Platten mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 0,05 infiziert. Während der Inkubationszeit wurde das Transfektionsgemisch von Transfektionsreagenz und Vektorplasmid (nach den Angaben des Herstellers) in einem Verhältnis von 3:1 in serumfreiem Medium hergestellt. Das fertige Transfektionsgemisch wurde nun tropfenweise dem Inokulat auf der Zellkultur zugegeben.

Einen ersten Eindruck über den Erfolg der HR bekam man bei der Begutachtung der HR-Platte 12 bis 24 Stunden nach der Transfektion/Infektion unter dem Umkehr-Fluoreszenz-Mikroskop. Dann waren bei entsprechendem Anregungslicht diejenigen Zellen erkennbar, die erfolgreich den Reporter des Vektorplasmids, hier also ein fluoreszierendes Protein, exprimierten. Der

tatsächliche Anteil der transfizierten Zellen, die außerdem homolog rekombinierte Viren beinhalteten, ließ sich dann aber erst nach der ersten Passage beurteilen. Dazu wurden die Inhalte der HR aus den Zellkulturplatten-Vertiefungen geerntet, also der Zellrasen mittels steriler Zellkulturschaber vom Boden der Vertiefung geschabt und möglichst der gesamte Inhalt in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieses erste Virusmaterial wurde bei -20°C gelagert.

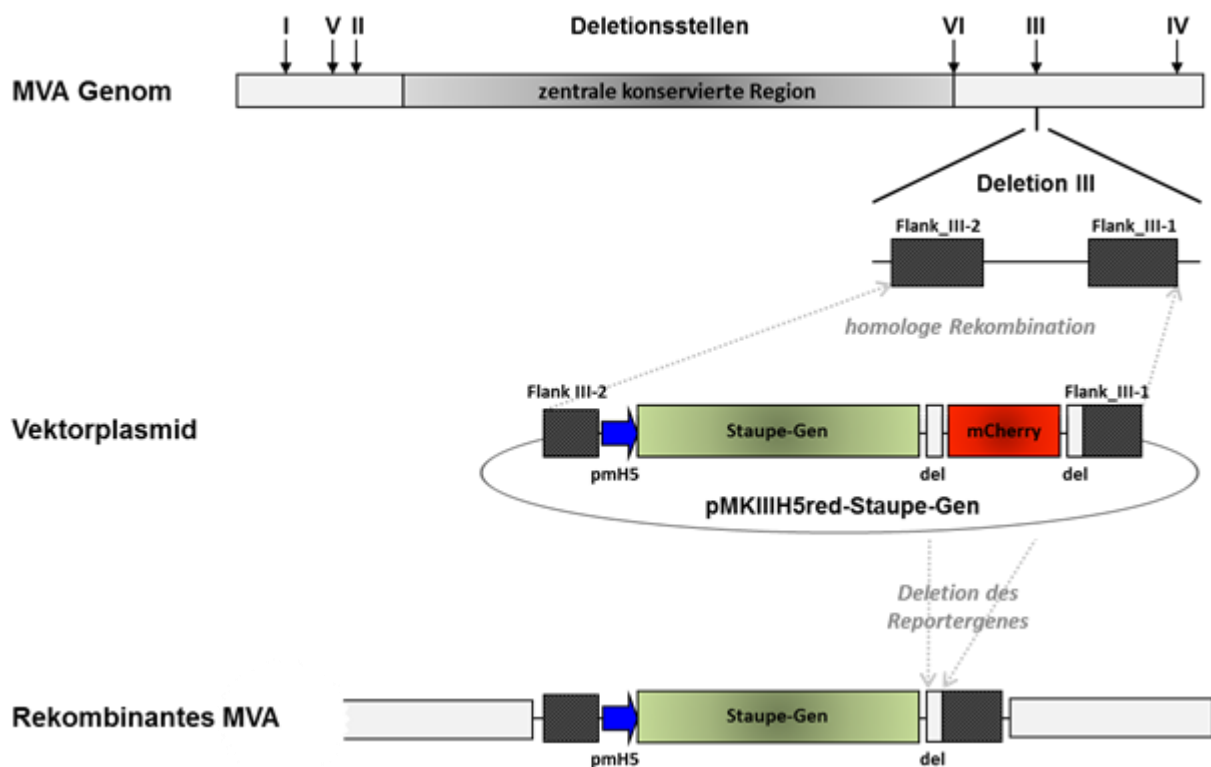


Abbildung 10: Schema Generierung rekombinanter MVA-Viren durch homologe Rekombination

18 Isolierung rekombinanter Virus-Klone (*plaque picking*)

Nachdem aufgrund einer hohen Verdünnung theoretisch ein Viruspartikel eine Zelle infiziert und sich dann die Infektion konzentrisch ausbreitet unter den benachbarten Zellen, spricht man von einem Klon. In praxi handelt es sich jedoch bei einem sogenannten Klon um eine Population infizierter Zellen, die mindestens die Rekombinante, aber bei Verwendung eines Ausgangsvirus ohne Reporter, möglicherweise auch Wildtypvirus enthalten. Ziel der klonalen Aufreinigung der MVAs ist eine Virussuspension ausschließlich aus Rekombinanten bestehend. Um dies zu erreichen, gibt es verschiedene molekularbiologische Strategien der Anreicherung der rekombinanten Viren. Die Rekombinanten in dieser Arbeit wurden durch

Plauepicking aufgrund von Diskriminierung mittels fluoreszierender Reportergene aufgereinigt. MVA-cdvM wurde auf der Basis eines MVA-Wildtyps ohne Reporter, die anderen Konstrukte jedoch auf der Basis des GFP-MVA, generiert, wodurch das Erreichen der Wildtypfreiheit um einiges erleichtert wurde. Abbildung 11 zeigt verschiedene Klone in zwei verschiedenen Anregungsfiltern. Ein Klon lässt eine Mischinfektion mit Wildtyp GFP-MVA (grün) und der Rekombinante (rot) erkennen.

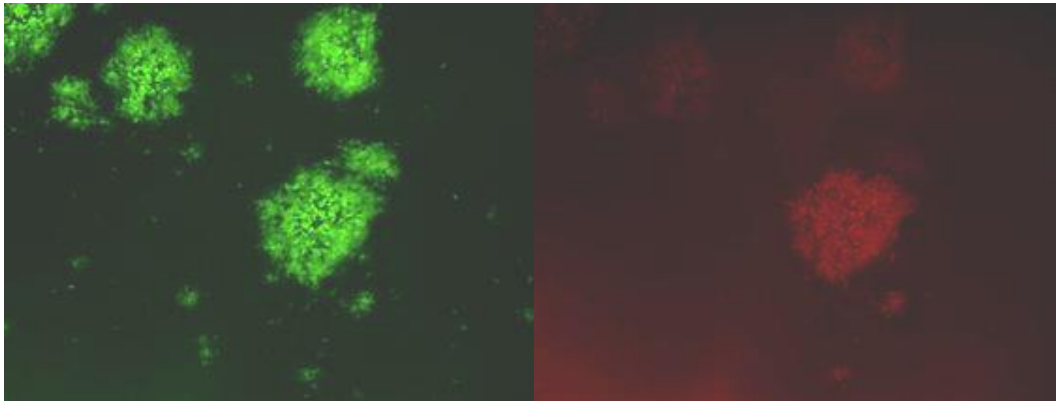


Abbildung 11: Mischinfektion Rekombinante (rot) mit ihrem Wildtyp GFP-MVA (grün)

Für den ersten Schritt wurden mehrere 6-Loch-Platten mit 90% konfluenten DF-1-Zellen wie bereits oben beschrieben hergestellt. Das aus dem Transfektions-/Infektions-Experiment gewonnene Material wurde wie unter Punkt 19 beschrieben jeweils dreimal eingefroren und aufgetaut, sowie geschallt. Dann wurden 10µl dieser so vorbereiteten Zellsuspension in einem Milliliter Infektionsmedium pro Vertiefung gegeben. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei 37 °C im CO₂-Brutschrank wurden die Zellen dann mit einem Milliliter Erhaltungsmedium gefüttert.

Bereits nach 12 Stunden sind erste infizierte Zellen am Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Der Zeitpunkt des ersten Pickens hängt von dieser Begutachtung ab.

Nach der Identifikation der Klone wurden diese auf der Unterseite der Zellkulturplatte mit einem wasserfesten, dünn schreibenden Fasermaler markiert. Dazu wurde ein Klon in der vierfachen Vergrößerung am Fluoreszenz-Umkehrmikroskop (Fluoreszenz-Mikroskop Olympus CKX41, Olympus) scharf gestellt und der Filter, also das Anregungslicht, des Reporters der Rekombinante gewählt. Dann wurde der Fasermaler unter Sichtkontrolle auf den Rand des Objektivs gelegt. Nun konnte wieder über die Okulare die Annäherung der Spitze des Stiftes an den anvisierten Klon verfolgt werden. Die resultierende Markierung war punktförmig, lag genau auf dem Klon und war auch so bemessen, dass sie mit dem bloßen

Auge später beim Picken gut erkennbar war.

Diese so markierten virusinfizierten Zellen wurden anschließend unter einer Sicherheitswerkbank mit sterilen Spitzen einer Eppendorfpipette in einem Volumen von 10µl Medium gepickt. Dabei wurde die Pipette senkrecht auf den Boden der Zellkulturplatte gesetzt und erst dann vorsichtig der gedrückten Kolbenhub betätigt, ohne mit der Pipettenspitze zu verrutschen. Die so gewonnenen *plaquepicks* der Passage I wurden in ein Volumen von wiederum 10µl Zellkulturmedium, in bereits vorher beschrifteten Eppendorf-Reaktionsgefäßen, gegeben. Diese *plaquepicks* wurden dreimal eingefroren, aufgetaut und geschallt. Danach wurden die bereits am Tag zuvor angelegten DF-1-Zellkulturplatten mit den einzelnen *plaquepicks* in Verdünnung infiziert.

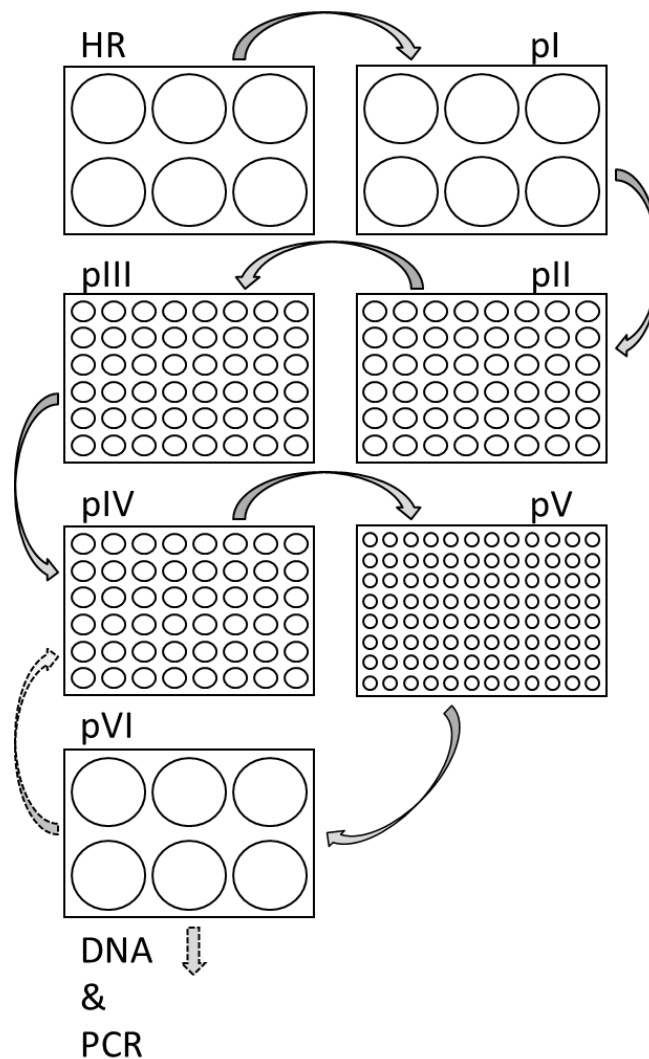


Abbildung 12: Schema der Aufreinigung rekombinanter MVAs über *plaque picking*. Ausgehend von der Homologen Rekombinations-Platte (HR) beginnt das Passagieren der Mischpopulation aus Rekombinanten und Wildtyp-Viren. Passagen (pI und folgende) sind hier in Form von schlanken Pfeilen dargestellt. Gestrichelte Pfeile hingegen zeigen die Möglichkeiten der Adaption des Protokolls, wie Kontrollschritte und weitere Passagen auf.

Dieser Schritt wurde bei Passage II bis IV auf 48-Loch-Platten wiederholt. Danach wurde ein sehr stringenter Schritt unter Verwendung von 96-Loch-Zellkulturplatten vollzogen. Bei der folgenden Passage wurde der gesamte Inhalt der betreffenden Vertiefung geerntet, da hier ein sicheres Picken durch die hohen Wände und die geringe Grundfläche nicht gewährleistet ist. Nach der starken Ausdünnung der Viren im letzten Schritt wurde ein Vermehrungsschritt auf einer 6-Loch-Platte angeschlossen, bei dem außerdem beim Auswachsen der Klone optisch (über die Fluoreszenz) entschieden wurde, ob sich hiernach die Ernte für eine DNA-Extraktion mit anschließender Kontroll-PCR und dann, falls in Ordnung, auch eine weitere Vermehrung oder eben erneute Passagen zur weiteren Aufreinigung folgen sollten. Die Abbildung 12 stellt die Abfolge schematisch dar.

Um eine weitere Kontrollinstanz, außer der Sichtkontrolle per Fluoreszenzmikroskopie, zu haben, wurden je nach Fragestellung verschiedene PCRs durchgeführt.

Bei der Fragestellung nach der erfolgreichen Insertion wurden, zusätzlich zu der Expression der fluoreszierenden Reportergene, spezifische PCRs auf die insertierten Gene gemacht, bei der Fragestellung nach der Reinheit der Rekombinanten bzw. dem Fortschritt der Selektion PCRs, mittels Primer, die in den *flanking regions* binden. Bei der letztgenannten, sogenannten Wildtyp-PCR (WT-PCR), kann anhand der Größe der PCR-Fragmente auf einem Agarosegel gezeigt werden, ob die Insertionsstelle leer ist, also nur eine geringe Größe aufweist oder eben eine Fragmentgröße von leerer Insertionsstelle plus Insertgröße (also ein *shift* zu sehen ist).

Nachdem die kleineren Fragmente der WT-PCR theoretisch in der PCR-Reaktion bevorzugt gebildet werden, ist eine gute Sensibilität zu erwarten. Die gewünschten Insertfragmente lassen sich tatsächlich erst bei Reinheitsgraden um 90% darstellen. Bei der Gewinnung der Proben für eine PCR-Kontrolle ist grundsätzlich darauf zu achten, dass die Menge des nachzuweisenden Virus in der Zellkultur groß genug ist. Deshalb ist der ZpE bzw. die Fluoreszenz vor der Probennahme daraufhin zu kontrollieren.

19 Herstellung eines Virusstocks

Um ausreichend hochtitriges Virusmaterial zur Verfügung zu haben, wurden zumeist zehn T175-Zellkulturflaschen mit einer möglichst hohen Infektionsdosis inokuliert und nach zwei bis drei Tagen p.i., abhängig vom Auftreten eines ZpEs, geerntet. Dazu wurde die gesamte Zellkulturflasche dreimal eingefroren und wieder aufgetaut und eventuell weiterhin adhärente

Zellreste durch schütteln im angetauten Zustand des Zellkulturmediums oder unter Benutzung steriler Zellkulturschaber vom Boden der Flasche gelöst. Der Inhalt der Flaschen wurde gepoolt und mittels Ultraschall behandelt. Dazu wurde das geschlossene Gefäß mit der Virussuspension auf die Membran des Schallbechers des Ultraschallgeräts (Sonopuls, Bandelin electronic) verbracht und dort fixiert. Der Schallbecher war im Vorfeld mit Eiswasser befüllt worden, um eine Erwärmung der Virussuspension bei ihrer Schallbehandlung zu verhindern. Dann wurde unter persönlichen Arbeitsschutz-Vorkehrungen (Gehörschutz) dreimal eine Minute bei 100%iger Intensitätseinstellung geschallt. Dazwischen wurde stets gevortext und bei Bedarf auch Eis im Schallbecher nachgefüllt.

20 Titerbestimmung einer MVA-Virus-Suspension

Eine quantitative Analyse der MVA-Virusstocks erfolgte mittels Bestimmung der plaquebildenden Einheiten (pBE). Um die Plaques deutlich sichtbar zu machen, wurde eine spezifische Immunfärbung durchgeführt. Das aufgetaute und mittels Ultraschall behandelte Virusmaterial wurde hierfür in log₁₀-Stufen-Reihenverdünnungen in sterilen Reagenzgläsern mit RPMI 1640 Medium verdünnt. Die erhaltenen Verdünnungsstufen wurden auf 6well-Zellkulturplatten mit 90% konfluenten DF-1-Zellen ausgebracht. Pro Vertiefung wurde jeweils 1ml gegeben. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei 37°C wurde Erhaltungsmedium zugegeben. 48 Stunden p.i. erfolgte die Fixierung der Zellen nach Entfernung und der Zugabe von eiskaltem Fixativ bestehend aus einem 1:1 Methanol:Aceton-Gemisch. Nach zwei Minuten wurde das Fixativ entfernt und die Zellen luftgetrocknet. Anschließend wurden die fixierten Zellen für 60 Minuten mit PBS mit 3% FKS bedeckt (Blocken des unspezifischen Hintergrundes) und nach dessen Entfernung mit polyklonalem anti-Vacciniavirus Kaninchen-Serum (BP1076, Acris; Verdünnung 1:2000 in PBS 3%) inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem mäßig rotierenden Schüttler. Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen mit FKS-haltigem PBS. Als Sekundärantikörper wurde ein Peroxidase gekoppeltes, polyklonales Ziegenserum (anti-rabbit IgG, 7074V, Cell Signaling) in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS 3% verwendet. Dieser Antikörper wurde 45 Minuten bei RT auf einem mäßig rotierenden Schüttler inkubiert. Abschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen und 1ml eines Peroxidase-Substrates (TrueBlue, KPL) zugegeben.

Die MVA-Plaques färbten sich innerhalb weniger Minuten blau (siehe Abb.24 links) an und konnten im Anschluss unter dem Umkehrmikroskop ausgezählt werden. Die ausgezählte Zahl

der gefärbten Plaques (siehe Abb. 13), multipliziert mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor, ergeben die PbE per Inokulumvolumen. Zur statistischen Absicherung wurde jede Titration im Vierfachansatz durchgeführt und die Ergebnisse arithmetisch gemittelt.

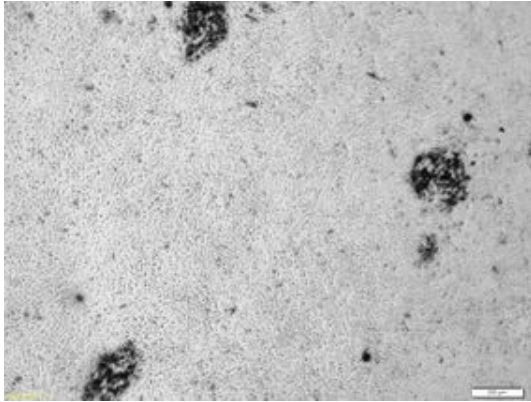


Abbildung 13: gefärbte Plaques auf DF-1-Zellen

21 Herstellung von Proteinextrakten aus kultivierten Zellen

Aufgrund von hier nicht abgebildeten Ergebnissen von Voruntersuchungen zur Immundetektion von Staupeproteinen, wurden die Proben für die Western Blot Analysen des Matrix-Proteins und der beiden Glykoproteine unterschiedlich geerntet. Die infizierten Zellmonolayer wurden nach der geplanten Zeit p.i. mit sterilem PBS gewaschen, dann mit einem sterilen Zellschaber geerntet und zwei Minuten bei 11000U/Min in Eppendorf-Reaktionsgefäßen pelletiert. Im Falle des Matrix-Proteins wurde anschließend der Überstand abgenommen und das Pellet bis zur Verwendung bei -40°C eingefroren oder sofort in 50µl PBS resuspendiert und dieselbe Menge zweifach Laemmli-Auftragepuffer hinzupipettiert. Die Pellets der beiden Glykoproteine wurden in 50µl TLB-Lysis-Puffer resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 20 Minuten bei 14000U/Min erneut zentrifugiert, hier jedoch der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. Dieses Lysat wurde nun wie die M-Protein-Proben entweder bei -40°C eingefroren oder sofort 50µl zweifach Laemmli-Auftragepuffer hinzupipettiert. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 5 Minuten bei 98°C gekocht (ThermoMixer, Eppendorf).

22 Western Blot

Diese Methode zur Detektion und Untersuchung von Proteinen gliedert sich in drei Arbeitsschritte: Gelelektrophorese im Polyacrylgel, Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Membran und Nachweis der Proteinbanden mittels spezifischer Antikörper, die Immundetektion.

Diese drei Abschnitte werden im Folgenden einzeln behandelt.

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Auftrennung im elektrischen Feld, wie bei der Agarosegel-Elektrophorese. Hier werden jedoch außerdem durch Natriumdodecylsulfat (SDS) und β -Mercaptoethanol reduzierende Bedingungen geschaffen. Das heißt, dass die Proteine im Gel denaturiert vorliegen und durch das Abschirmen der Ladung mittels SDS nur aufgrund ihrer Größe getrennt werden.

22.1 Herstellung von diskontinuierlichen SDS-PAGE-Gelen

Folgende Rezepte wurden beim Gießen der SDS-PAGE-Gele verwendet:

Tabelle 11: Mengenangaben für 2 oder 4 SDS-PAGE-Gele getrennt nach Gelverwendung

Sammelgel (4%)	5 ml	10 ml
30% Acrylamide/Bis (29:1)	830 μ l	1 ml
1 M Tris (pH 6,8) 4x	630 μ l	2,5 ml
H ₂ O _d	3,4 ml	6,4 ml
10% SDS	50 μ l	100 μ l
10% APS	50 μ l	100 μ l
TEMED	5 μ l	10 μ l

Trenngel (10%)	20 ml	35 ml
30% Acrylamide/Bis (29:1)	6,7 ml	11,73 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	5 ml	8,75 ml
H ₂ O _d	7,9 ml	13,83 ml
10% SDS	200 μ l	350 μ l
10% APS	200 μ l	350 μ l
TEMED	8 μ l	35 μ l

Das feste Gel wurde in der vertikalen Elektrophorese-Apparatur eingespannt und die Laufkammern mit einfachem SDS-PAGE-Laufpuffer bis über die Taschen gefüllt. Nun wurden die Kämme vorsichtig gezogen. Dann konnten 5µl Proteinmarker (Colorplus Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230kDa), NEB) und jeweils 10µl der Proben aufgetragen werden.

Die Elektrophorese erfolgte bei 80V und nahm damit zwei Stunden in Anspruch.

22.2 Membrantransfer

Nach der SDS-PAGE schloss sich ein Elektroblothing-Schritt an, bei dem die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert wurden. Zuvor wurde der 46 x 57cm Bogen Whatman Blotting Papier mittels einer Papierschneidemaschine auf passende 6x8 cm-Stücke zurechtgeschnitten. Auch die Nitrocellulose-Membran (Whatman Protran 0,2µm Nitrocellulose Membran) wurde auf dasselbe Maß zurechtgeschnitten und am oberen rechten Rand mit einem Bleistift, gemäß der aufgetragenen Proben, beschriftet.

Die Transferkassette wurde aufgeklappt und von der schwarzen Seite her (Gelseite) beladen. Dazu wurde ein Schwämmchen oder Fiberpad in 1x Transfer-Puffer getränkt und auf die schwarze Seite gelegt. Danach folgten zwei ebenso getränkte Blottingpapiere. Die Gelapparatur wurde auseinandergenommen und die Taschen am oberen Rand des Gels entfernt. Das Gel wurde kurz in 1x Transfer-Puffer gespült und dann auf dem begonnenen Stapel so abgelegt, dass keine Luftblasen entstehen konnten. Auf das Gel folgten die ebenfalls getränkte Membran und dann erneut zwei Blottingpapiere, sowie das Fiberpad. Nach Ausrollen des Stapels, um etwaige Luftblasen zu entfernen, wurde die Transferkassette geschlossen und in die Blotting-Apparatur (Mini Trans-Blot Cell, Biorad) verbracht, die daraufhin mit einfachem Transfer-Puffer aus dem Kühlschrank aufgefüllt wurde.

Der Transfer selbst erfolgte für 75 Minuten bei einer konstanten Stromstärke von 250mA. Dazu wurde die Blotting-Apparatur bei 4°C in den Kühlraum gestellt.

22.3 Immunodetektion von Proteinen

Nach der Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte ein kurzes Abspülen der Membran in 1x TBST-Puffer, bevor die Membran in ein 50ml Falcon verbracht wurde. In

diesem Röhrchen wurden die weiteren Schritte auf dem Kipproller (Phoenix Instrument) vollzogen. Der Blockingschritt, bei dem unspezifische Bindungen auf der Membran durch Inkubation in Blocking-Puffer abgesättigt werden, fand entweder für eine Stunde auf Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C statt.

Danach wurde mit 1x TBST-Puffer dreimal gewaschen. Der erste Antikörper wurde in 1x TBST-Puffer mit 2,5% BSA verdünnt und nun in das entsprechende Falcon mit der Membran pipettiert. Bei den meisten Antikörpern war eine Inkubation von einer Stunde auf Raumtemperatur ausreichend. Beim Nachweis des F-Proteins wurde jedoch die Inkubation bei 4°C über Nacht durchgeführt. Nach erneutem dreimaligen waschen mit 1x TBST-Puffer konnte der zweite, ebenfalls in 1x TBST-Puffer mit 2,5% BSA verdünnte Antikörper zugegeben werden. Diese Inkubation erfolgte für eine Stunde bei RT auf dem Kipproller. Nach dem letzten dreimaligen Waschschrift mit 1x TBST-Puffer wurde die zuvor auf 8x10cm zurechtgeschnittene Reaktionstasche (Autoklavierbeutel, Roth) beschriftet und aufgeklappt. Das Substrat (Amersham ECL Prime Western blotting reagent, GE Healthcare) für die Meerrettich-Peroxidase, die als Konjugat den Zweitantikörpern dieser Arbeit anhaftete, konnte zubereitet und auf die Reaktionstasche aufgebracht werden. Nun wurde die Membran mit einer Pinzette aus dem Falcon gezogen und auf den 1ml-Tropfen Substrat aufgelegt werden, wobei auf Luftblasenfreiheit geachtet wurde.

Nach 5 Minuten Inkubation bei RT konnte die Detektion der Chemilumineszenz und Dokumentation der markierten Proteinbanden an den Dokumentationsgeräten (MicroChemie Chemiluminescence, Biostep bzw. ChemiDoc MP System, Biorad) durchgeführt werden.

Tabelle 12: Antikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle	Anwendung WB	Konjugat
Anti-Actin (20-33)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf	1:200	-
Anti-cdvF	Veronika von Messling	1:2000	-
Anti-cdvH	Veronika von Messling	1:10000	-
Anti-cdvM	Veronika von Messling	1:10000	-
Anti-rabbit IgG	Cell Signaling Technology	1:2000	HRP
HRP-Protein A	Invitrogen, Darmstadt	1:8000	HRP

Als weiterer Schritt der Qualitätskontrolle wurde eine Sequenzierung veranlasst. Dieser Schritt (wie alle anderen Sequenzierungen) wurde aber bei Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt und wird somit nicht explizit erläutert. Die besten Ergebnisse wurden bei

Sequenzierungslängen bis zu 800bp erreicht. Nachdem die Staupevirusgene aber recht lange Sequenzen haben, wurde auf die Sequenzierung von Teilbereichen und das spätere zusammenfügen dieser Teile, also ein contig-assembly gesetzt.

23 Contig-Assembly

Beim Assemblieren der Sequenzabschnitte einer erfolgten Sequenzierung eines längeren Abschnittes einer *region of interest* (ROI) zu einem contig ist vor allem auf eine ausreichende Länge der Überlappungen der einzelnen Fragmente zu achten. Die sollten mindestens 25bp lang sein, aber je länger solche Überlappungen sind, umso sicherer wird der Erhalt eines korrekten *contigs*, wie in Abb. 14 gezeigt. Die Qualität der einzelnen Sequenzabschnitte spielt auch hier eine große Rolle und eine gute *coverage*, also eine Mehrfache Abdeckung der gesamten Sequenz, wäre natürlich von Vorteil. Dagegen spricht jedoch, dass der erreichte Zuwachs an Information durch einen vermehrten Einsatz von finanziellen Mitteln meist nicht in Relation steht. Gerade in den Bereichen nach den Primerbindungsstellen (der Primer für die Sequenzierungsreaktion) ist dennoch auf jeden Fall darauf zu achten, dass hier mindestens zwei vergleichbare Sequenzen vorliegen, um diese meist nicht zweifelsfrei beurteilbaren Sequenzabschnitte kontrollieren zu können.

Es besteht die Möglichkeit das *contig* bei der Erstellung bereits an der Referenzsequenz auszurichten, oder beide Abschnitte später durch ein *Alignment* zu vergleichen.



Abbildung 14: Contig-Assembly am Beispiel des Hämagglutinins von S15 unter Verwendung von sechs Sequenzen.

Bildbereich, die die gegenläufigen Sequenzen der eingesandten PCR-Fragmente darstellen. Auch zu erkennen sind die beiden Überlappungsbereiche und die Einzelsequenzen im unteren Bildbereich.

24 Untersuchung der Replikationscharakteristika

Diese werden anhand von Wachstumskurven eingeschätzt. Die Kurvenform lässt Rückschlüsse auf die Permissivität der untersuchten Zellen zu, auf die Geschwindigkeit der Infektion und Potenz der infektiösen Partikel zu. Wachstumskinetiken dienen damit der Charakterisierung verschiedener Viren in Zellkultur und der vergleichenden Beurteilung ihrer Replikation.

In dieser Arbeit wurden Rekombinanten mit dem WT-MVA verglichen, um zu zeigen, dass die Inserts keine Replikationsdefizienzen zur Folge hatten und um die weiterhin gegebene biologische Sicherheitsstufe 1 zu dokumentieren.

Für die Generierung solcher Wachstumskurven von MVAs wurden 6-Loch-Zellkulturplatten der gewünschten Zelllinie analog des bereits zuvor erwähnten Protokolls infiziert, hier jedoch mit einer MOI von 0,01. Die Proben der einzelnen Zeitwerte (0, 12, 24, 48 und 72 Stunden p.i.) wurden nun, nachdem die Zellen mit einem sterilen Zellkulturschaber vom Boden gelöst worden waren, möglichst vollständig in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C bis zur Titration eingefroren. Die Bestimmung der Menge infektiöser Partikel in den jeweiligen Proben wurde gemäß des, unter Punkt 20 ausgeführten, Protokolls der Titerbestimmung durchgeführt.

IV. ERGEBNISSE

Generierung des Vektorplasmids

Um ein rekombinantes MVA zu erstellen, welches das Matrix-Protein des Staupevirus exprimiert, wurden die drei verfügbaren CDV-Gensequenzen (CADMPA, EU072199, EU310405) und 16 CDV-Sequenzen der kompletten Genome (Accession Numbers: AB474397.1, AF014953.1, AF164967.1, AF305419.1, AF378705.1, AY386315.1, AY386316.1, AY443350.1, AY445077.2, AY542312.2, AY649446.1, EU726268.1, GU138403.1, HM046486.1, HM063009.1, NC_001921.1) vom NCBI (National Center for Biotechnology Information) heruntergeladen. Die Sequenzen wurden *aligned* (MegAlign, Lasergen-Software, DNASTar) und die Genomsequenzen auf die Länge des Matrixgens (1008bp) gekürzt. Aus diesen 19 Sequenzen wurde deren Konsensus-Sequenz ermittelt und im Hinblick auf eine möglichst optimale Expression in rekombinanten MVA-Viren untersucht. Bereiche der Gensequenz mit mehrfachen (>4) Wiederholungen der Nukleotide GC bzw. mit Stoppsignalen für die frühe virale Transkription (TTTTTNT) wurden mutiert, ohne die kodierte Aminosäuresequenz zu verändern. Die erhaltene Sequenz (siehe Anhang) erlaubte die Herstellung einer synthetischen cdvM cDNA (GeneArt Regensburg).

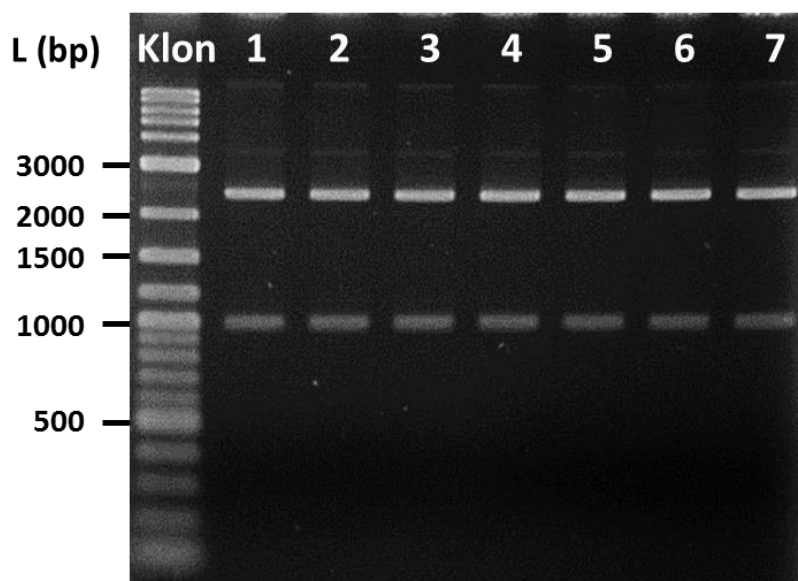


Abbildung 15: Restriktionsanalyse (*AscI* x *PmeI*) des Plasmids cdvM-geneCON_pMA-T
 Nach Elektrophorese der DNA aus *E. coli* Mini-Kulturen (Klone 1-7) in 1% Agarose konnten DNA Fragmente mit der erwarteten Größe für das Insert cdvM (ca. 1000bp) bzw. das linearisierte Träger-Plasmid (ca. 2400bp) nachgewiesen werden; Längenstandard NEB 2log.

Die Qualitätskontrolle der synthetischen DNA erfolgte durch Restriktionsanalyse des gelieferten Plasmids cdvM-geneCON_pMA-T nach Transformation und Amplifikation in *E. coli*. Die Behandlung der aus Mini-Präparationen erhaltenen Plasmid-DNA mit den Restriktionsendonukleasen *AscI* und *PmeI* und die anschließende Agarosegel-Elektrophorese identifizierte ein kloniertes DNA-Fragment von ca. 1000 bp, der erwarteten Größe der Gensequenz von cdvM (Abb. 15).

Nach diesem Kontrollschritt wurde ein ausgewählter Bakterienklon mittels Übernachtskultur vermehrt und eine Midi-Präparation zur Gewinnung der Plasmid-DNA durchgeführt. Eine erneute Restriktionsbehandlung (*AscI* & *PmeI*) erlaubte die Isolierung und präparative Gelaufreinigung der DNA der M-Gensequenz.

Nach Auffüllen der überhängenden Einzelstrangsequenzen der isolierten DNA (durch den Einsatz eines Blunting-Kits, siehe Tabelle 8: Restriktionsenzyme unter III.10) konnte die M-Gensequenz in die mit *SmaI* geöffnete DNA des MVA-Vektorplasmides pLW-73 inseriert werden. Dabei sollte die M-Gensequenz unter die Transkriptionskontrolle des synthetischen, in pLW-73 bereits enthaltenen Vacciniavirus-spezifischen early-late Promotors PmH5 gestellt werden. Die blunt-end-Ligation der DNA resultierte in der Bildung des neuen Vektorplasmids pLW73_cdvM, welches nach Transformation in kompetente DH5 α -Bakterien (5-alpha Competent *E. coli*) isoliert werden sollte.

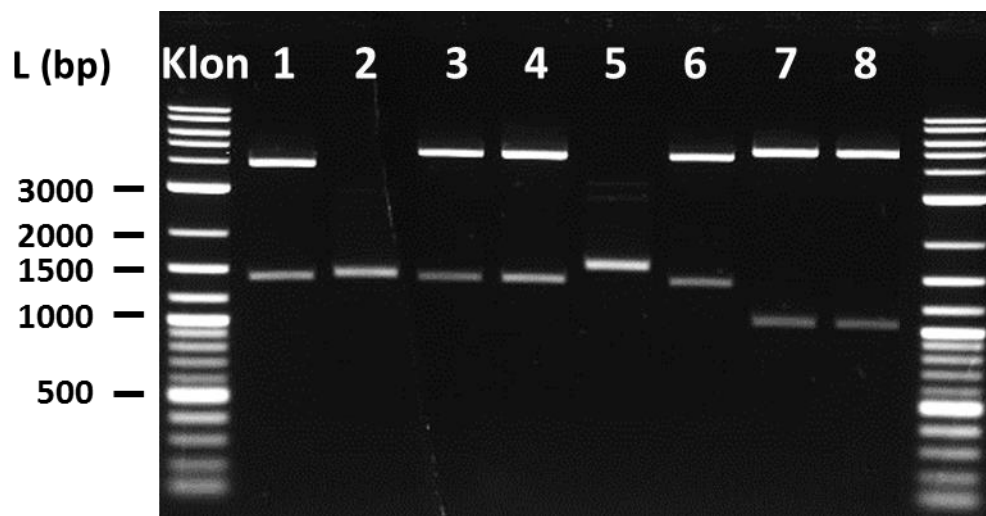


Abbildung 16: Restriktionsanalyse (*HindIII*) des MVA-Vektorplasmid pLW-73_cdvM.

Nach Elektrophorese im Agarosegel konnten anhand des zu erwartenden Bandenmusters die Plasmide der Klone 7 und 8 selektiert werden: ca.1000bp (cdvM-Insert) und ca. 5000 bp (pLW73). Längenstandard NEB 2log.

Gepickte Bakterienklone wurden vermehrt und nach einer Mini-Präparation das jeweils gewonnene Vektorplasmid mittels *HindIII*-Restriktion und anschließender Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (Abbildung 16). Das Bandenmuster identifizierte die Klone 7 und 8 als korrekte Vektorplasmide (eine Bande bei ca. 1000bp und eine bei ca. 5000bp), nachdem das gesamte Plasmid mit Insert (pLW-73_cdvM) eine Länge von 6065bp hat.

Bakterienklon 8 wurde ausgewählt und abermals amplifiziert. Durch Maxi-Präparation konnte so eine ausreichende Menge an Vektorplasmid (pLW-73_cdvM, Abb. 19) für die Transfektions-Infektions-Versuche generiert werden.

Als Grundlage der Erstellung eines cdvF-Protein exprimierenden, rekombinanten MVA diente das Plasmid pCI-F (ursprünglich von Prof. Riccardo Wittek, Universität Lausanne zur Verfügung gestellt), welches das F-Gen des CDV-Stammes A75/17 (Accession Nr. AF112188.1) enthält.

Nach Retransformation und der anschließenden Mini-Präparation wurde mittels Restriktionsanalyse (*Bam*HI) die korrekte Größe des Insert überprüft. Das gewonnene Material konnte nun als Template für eine Schnittstelleninsertions-PCR eingesetzt werden. Dabei wurden Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Not*I und *Pme*I, sowie der MVA-early-Promotor PE3L eingefügt. Folgende Oligonukleotide ermöglichten die Synthese und Amplifikation des zu klonierenden DNA-Fragmentes (Abb. 17).

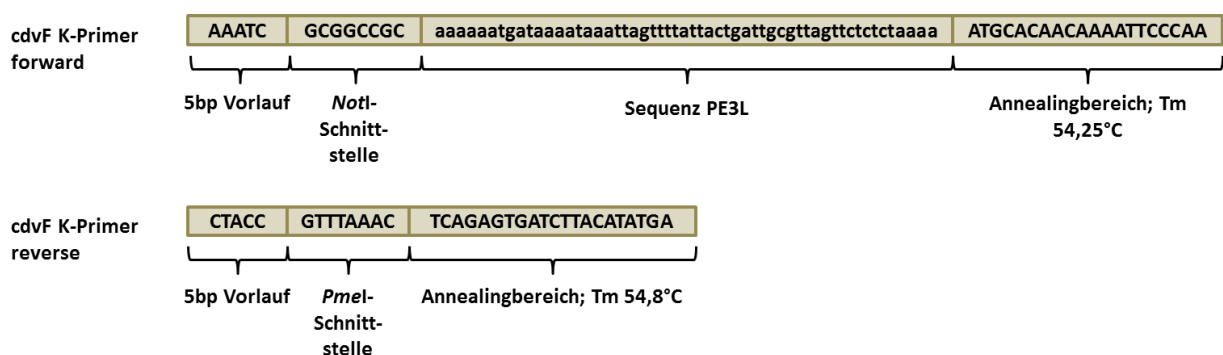


Abbildung 17: Architektur der Oligonukleotide zur Schnittstelleninsertion bei cdvF.

Die Klonierungs (K)-Primer bestehen aus einem Annealingbereich (komplementär zu den Enden des cdvF-Genes), den zu inserierenden Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme und jeweils einem Vorlauf von fünf Basenpaaren. Der Forward-Primer enthält außerdem die Sequenz des Promotors PE3L.

Die Größe des PCR-Produktes wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert und ergab das erwartete Molekulargewicht von 2052bp. Die DNA wurde aus dem Gel präpariert und

aufgereinigt. Das so gewonnene DNA-Insert konnte, wie die DNA des MVA-Vektorplasmides pMKIII red cherry, mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *PmeI* geschnitten werden. Danach erfolgten die Ligation und die Transformation in DH5 α -Zellen (5-alpha Competent *E.coli* (High Efficiency)).

Die gepickten Bakterienklone wurden mittels Restriktionsverdau (*NotI/PmeI*) auf das Vorhandensein des korrekten Plasmids pMKIII red cherry-cdvF kontrolliert.

Anschließend wurde ein positiver Klon vermehrt, um abschließend mittels einer Midi-Präparation das Vektorplasmid zu gewinnen. Danach erfolgte eine Sequenzierung, die zeigte, dass das F-Gen und der neue Promotor korrekt inseriert wurden. Nach der Retransformation und der Maxi-Präparation standen die Ausgangsmaterialien für die Erstellung des rekombinanten Virus MVA-cdvF mittels homologer Rekombination (HR) zur Verfügung.

Um die Möglichkeit der Koexpression von cdvF und cdvH zu untersuchen, wurde das rekombinante Virus MVA-cdvFH erstellt. Hierfür wurde neben dem Plasmid pMKIII H5 red cherry-cdvF außerdem noch das Hämagglutinin-Gen des Staupevirus benötigt. Es sollte in gegenläufiger Orientierung in das Vektorplasmid pMKIII H5 red cherry-cdvF inkloniert werden. Dafür mussten auch bei diesem Glykoprotein-Gen die entsprechenden Schnittstellen für Restriktionsenzyme angefügt werden. Das Ausgangsplasmid pCI-H, welches das Hämagglutinin-Gen des CDV-Stammes A75/17 (Accession Nr. AF112189.1) enthält, wurde ursprünglich ebenfalls von Prof. Riccardo Wittek, Universität Lausanne zur Verfügung gestellt.

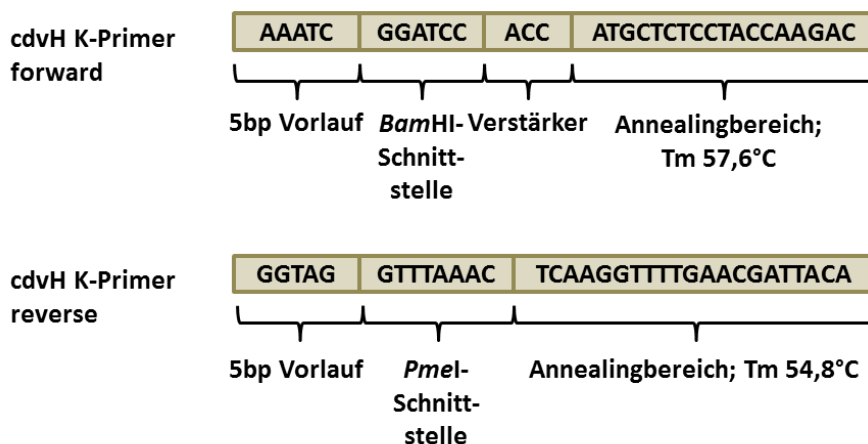


Abbildung 18: Architektur der Oligonukleotide zur Schnittstelleninsertion bei cdvH.

Die Klonierungs (K)-Primer bestehen aus einem Annealingbereich (komplementär zu den Enden des cdvH-Genes), den zu inserierenden Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme und jeweils einem Vorlauf von fünf Basenpaaren. Der Forward-Primer enthält außerdem eine Enhancer-Sequenz.

Nach Retransformation und der anschließenden Mini-Präparation wurde mittels Restriktionsverdau (*Acc65I* und *SalI*) die korrekte Größe des Insert (1021bp) festgestellt. Das gewonnene Material wurde nun als Template für eine Schnittstelleninsertions-PCR eingesetzt. Hierbei wurden Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *BamHI* und *PmeI* angehängt (siehe Abb. 18). Der Promotor zur Expression des *cdvH* Gens war der synthetische early-late Promotor *PmH5*, der sich bereits im Ausgangsplasmid *pMKIII H5 red cherry* (siehe Abb. 21) befand.

Die Größe des PCR-Produktes wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert und ergab die erwartete Länge von 1834bp. Die DNA des *cdvH* wurde aus dem Gel präpariert und aufgereinigt. Außerdem erfolgte an dieser Stelle eine Kontroll-Sequenzierung des PCR-Produktes.

Zur Insertion des *cdvF* waren, wie bereits beschrieben, die Restriktionsenzyme *NotI* und *PmeI* verwendet worden, dadurch konnte das *cdvH*-Gen nach Verdau mit *BamHI* und *PmeI* in gegenläufiger Orientierung zum *cdvF*-Gen in das Plasmid inseriert werden, wodurch ein Ablesen der beiden Zielgene mit jeweils einem anderen MVA-Promotor (und unterschiedlicher Transkriptionsaktivität) ermöglicht werden sollte (siehe Plasmid-Karte in Abb. 23).

Anschließend erfolgte die Ligation und die Transformation in Top 10-F'-Zellen (10-beta Competent *E.coli*). Nach dem Picken der Bakterienklone und einer Plasmid-Präparation wurde nach einem Kontrollverdau (*BamHI*) und anschließender Gelelektrophorese, welches die erwarteten Größen zeigte, eine Retransformation eines geeigneten Plasmids durchgeführt.

Nach Maxi-Präparation lag genug *pMKIII H5 red cherry-cdvFH* (Abb. 23) vor, mit dem die Erstellung des rekombinanten Virus erfolgen konnte. An dieser Stelle wurde auf eine Sequenzierung des gesamten inserierten Bereichs verzichtet, da nur Restriktionsenzyme an der Erstellung beteiligt waren und deshalb seit der Sequenzierung der Anteile *cdvF* und *cdvH* nicht von einer Änderung auszugehen war.

Im Folgenden sind Abbildungen der schematischen Plasmidkarten der Vektor- und ihrer Ausgangsplasmide als Übersicht dargestellt.

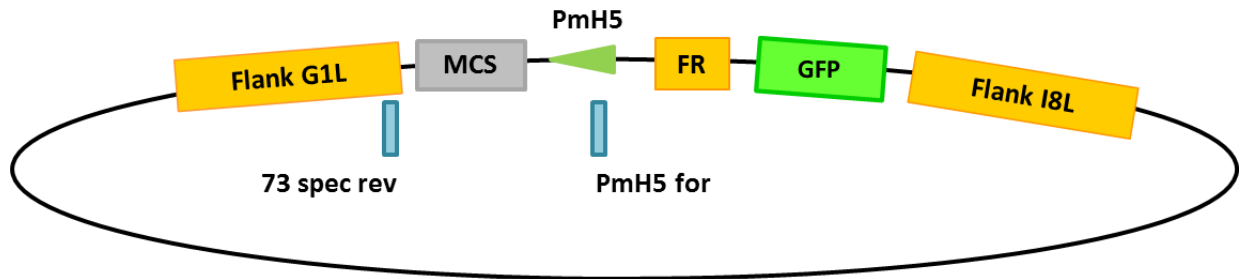


Abbildung 19: MVA-Vektorplasmid pLW-73, schematisch.

Flankierende MVA Gensequenzen (Flank I8L und Flank G1L) ermöglichen eine präzise Insertion von Fremdgenen in den Zwischengenenbereich der MVA-Leserahmen I8L und G1L, die Wiederholung einer zur Flank I8L identischen Gensequenz (Flank repeat, FR) dient einer Entfernung Reportergens (GFP) durch homologe Rekombination, ein Bereich mit mehreren Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen (*multiple cloning site*) ermöglicht die Insertion von Zielgensequenzen durch Klonierung; PmH5 Virus-spezifischer Promotor zur Transkriptionskontrolle der Zielgenexpression; 73 spec rev und PmH5 for bezeichnen Sequenzen für Oligonukleotide für die PCR-Amplifikation von inserierten Zielgensequenzen.

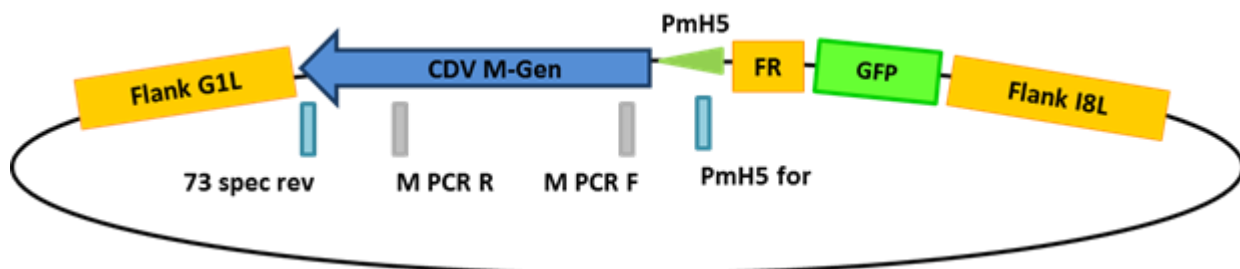


Abbildung 20: MVA-Vektorplasmid pLW-73_cdvM, schematisch.

Flankierende MVA Gensequenzen (Flank I8L und Flank G1L) ermöglichen eine präzise Insertion von Fremdgenen in den Zwischengenenbereich der MVA-Leserahmen I8L und G1L, die Wiederholung einer zur Flank I8L identischen Gensequenz (Flank repeat, FR) dient einer Entfernung Reportergens (GFP) durch homologe Rekombination; Insert cdvM; PmH5 Virus-spezifischer Promotor zur Transkriptionskontrolle der Zielgenexpression; 73 spec rev und PmH5 for bezeichnen Sequenzen für Oligonukleotide für die PCR-Amplifikation von inserierten Zielgensequenzen und M PCR F und R für die Amplifikation eines Teils des Inserts cdvM.

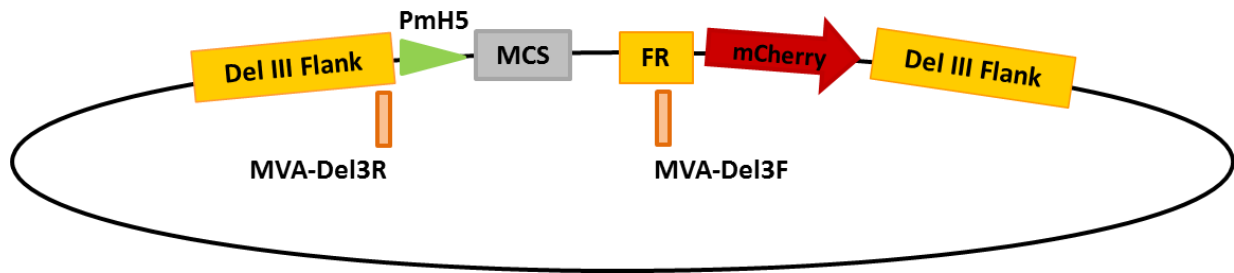


Abbildung 21: MVA-Vektorplasmid pMKIII H5 red cherry, schematisch.

Flankierende MVA Gensequenzen (Del III Flank) ermöglichen eine präzise Insertion von Fremdgenen an der Deletionsstelle III von MVA, die Wiederholung einer zu Del III Flank identischen Gensequenz (Flank repeat, FR) dient einer Entfernung Reportergens (mCherry) durch homologe Rekombination, ein Bereich mit mehreren Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen (*multiple cloning site*) ermöglicht die Insertion von Zielgensequenzen durch Klonierung; PmH5 Virus-spezifischer Promotor zur Transkriptionskontrolle der Zielgenexpression; MVA-Del3F und R bezeichnen Sequenzen für Oligonukleotide für die PCR-Amplifikation von inserierten Zielgensequenzen.

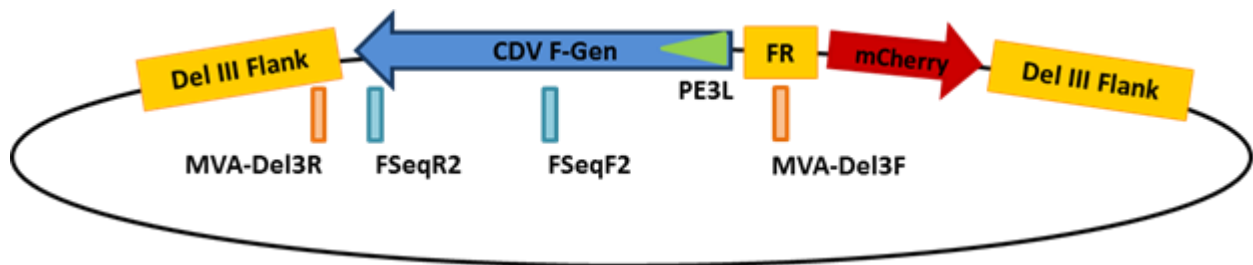


Abbildung 22: MVA-Vektorplasmid pMKIII H5 red cherry-cdvF, schematisch.

Flankierende MVA Gensequenzen (Del III Flank) ermöglichen eine präzise Insertion von Fremdgenen an der Deletionsstelle III von MVA, die Wiederholung einer zu Del III Flank identischen Gensequenz (Flank repeat, FR) dient einer Entfernung Reportergens (mCherry) durch homologe Rekombination; Insert cdvF; PE3L Virus-spezifischer Promotor zur Transkriptionskontrolle der Zielgenexpression; MVA-Del3F und R bezeichnen Sequenzen für Oligonukleotide für die PCR-Amplifikation von inserierten Zielgensequenzen und FSeqF2 und FSeqR2 für die Amplifikation eines Teils des Inserts cdvF.

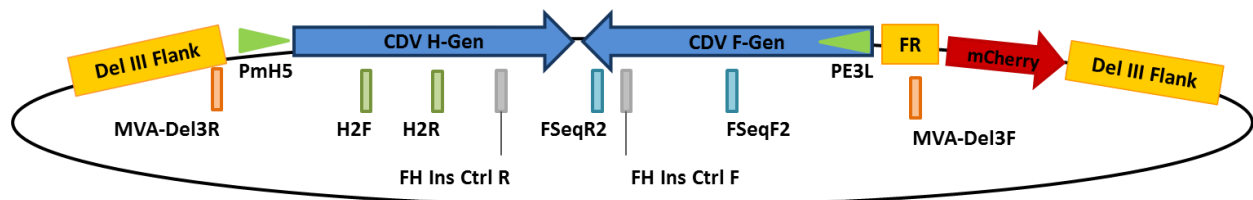


Abbildung 23: MVA-Vektorplasmid pMKIII H5 red cherry-cdvFH, schematisch.

Flankierende MVA Gensequenzen (Del III Flank) ermöglichen eine präzise Insertion von Fremdgenen an der Deletionsstelle III von MVA, die Wiederholung einer zu Del III Flank identischen Gensequenz (Flank repeat, FR) dient einer Entfernung Reportergens (mCherry) durch homologe Rekombination; Inserts cdvF und cdvH; PE3L und PmH5 Virus-spezifische Promotoren zur Transkriptionskontrolle der Zielgenexpression; MVA-Del3F und R bezeichnen Sequenzen für Oligonukleotide für die PCR-Amplifikation von inserierten Zielgensequenzen und FSeqF2 und FSeqR2 für die Amplifikation eines Teils des Inserts cdvF bzw. H2F und H2R für die Amplifikation eines Teils des Inserts cdvH.

Generierung und klonale Isolierung rekombinanter Viren

Um ein cdvM rekombinantes MVA zu erhalten, wurde eine Transfektion-Infektion durchgeführt. Dazu wurde das Plasmid pLW73_cdvM und das MVA F6 p583 verwendet. Die Isolierung der durch homologe Rekombination entstandenen MVA-Vektorviren erfolgte per Diskriminierung durch die Synthese des grünen Reporterfarbstoffes GFP (Expressionskassette im pLW-73 enthalten, siehe Abbildung 19) in den mit rekombinanten Viren infizierten Zellen. Diese rekombinanten Viren wurden in Zellkultur-Passagen über Vereinzelung der Infektionsherde (Plaques) klonal isoliert, bis in den Präparationen das ursprüngliche (nicht rekombinante) MVA F6 p583 (Wildtyp-Virus) nicht mehr nachweisbar war.

Zur Kontrolle der Freiheit von Wildtyp-Virus und zur Bestätigung der korrekten Insertion von Fremdgenen wurden Präparationen genomischer Virus-DNA mittels PCR (siehe Abb. 24) überprüft. Es wurden hierfür Oligonukleotide verwendet, die (i) spezifisch an die Zielgensequenzen (*genes of interest GOI*) binden und für diese spezifische DNA-Fragmente amplifizieren (Insert), die sich (ii) im Bereich der Flanks bzw. Promotoren anlagern (Insertionsstelle) und als Kontrolle dienen, die (iii) ein spezifisches DNA-Fragment für eine andere, nicht verwendete Deletionsstelle im MVA-Genom amplifizieren.

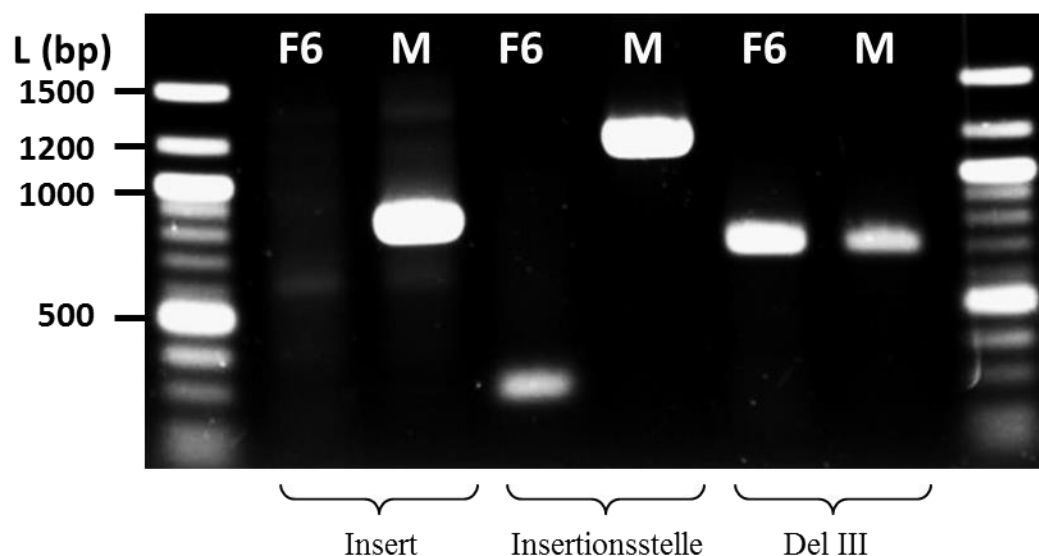


Abbildung 24: Kontrolle des rekombinanten MVA-cdvM mittels PCR.

Die Amplifikation eines Insert-spezifischen Fragmentes (Insert, 803bp) diente zum Nachweis des cdvM-Gens (M) im Genom des rekombinanten MVA (nicht im Wildtyp-Virus F6). Die PCR mit Oligonukleotiden im Bereich zwischen Flank und Promotor (Insertionsstelle) amplifiziert für F6 eine erwartete DNA-Bande von 109bp und für MVA-cdvM, durch den Insertion des M-Gens, eine DNA-Bande von 1130bp. Das kürzere Fragment des Wildtyp-MVA ist nicht vorhanden. Das PCR-Produkt (Del III) spezifisch für die nicht veränderte Deletionsstelle III ist bei beiden Viren gleich groß (542bp); Längenstandard NEB 1kb.

Nach Bestätigung der genetischen Homogenität (Freiheit von Wildtypvirus), wurde das rekombinante MVA-cdvM amplifiziert und titriert. Für die Transfektion/Infektion zur Erstellung des Konstruktes MVA-cdvF wurde ein rekombinantes MVA (hier Wildtyp-Virus) benutzt, welches ein grünes Fluoreszenzprotein (GFP für *green fluorescent protein*) exprimiert. Das GFP-Gen wird durch die homologe Rekombination mit der DNA des Vektorplasmids (pMKIII H5 red cherry-cdvF, siehe Abb. 22) deletiert und mit den zu inserierenden Gensequenzen ausgetauscht. Die mit dem neuen, rekombinanten MVA infizierten Zellen leuchteten nun rot, da der Reporterfarbstoff mCherry exprimiert wurde (*colour switch*).

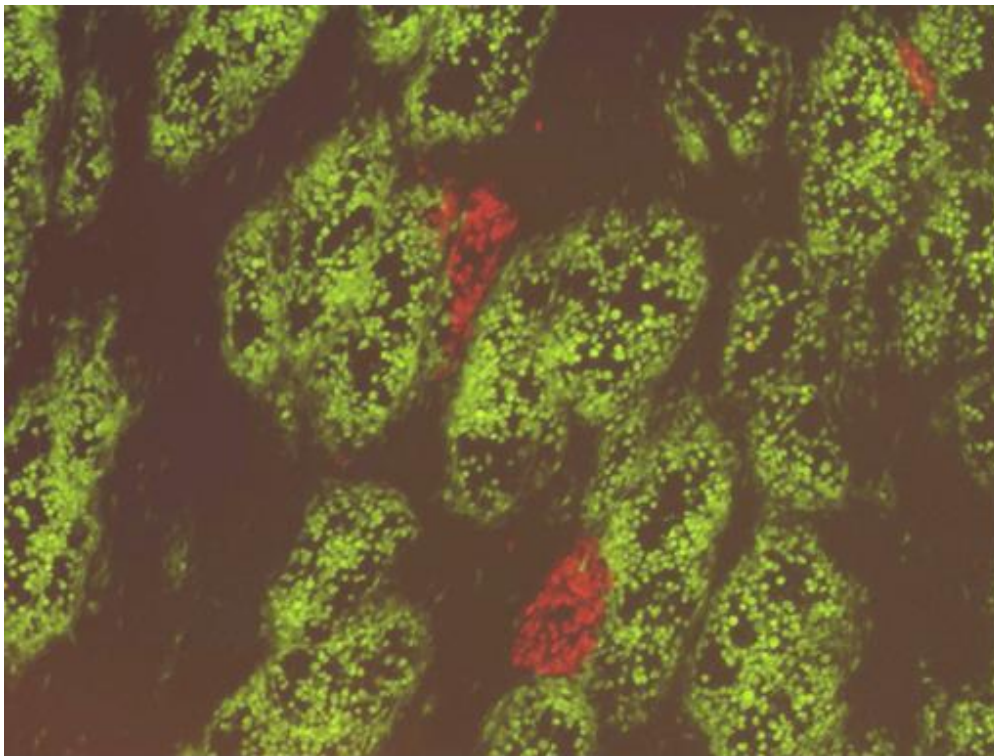


Abbildung 25: DF1-Zellen infiziert mit GFP-MVA und mit rekombinantem MVA-cdvF.

Durch gezieltes Picken von rot leuchtenden Zellen konnte das rekombinante MVA-cdvF, aus der Überzahl der Wildtyp-Viren (grün leuchtender GFP-MVA-Hintergrund), isoliert und vermehrt werden. Abbildung 25 zeigt fluoreszierende Foci infizierter Zellen (rot: MVA-cdvF, grün: GFP-MVA) zur Veranschaulichung der Farbselektion bei der Zellkulturpassage.

Schließlich diente die PCR-Analyse genomischer DNA zur Kontrolle der gewonnenen Viruspräparationen auf Freiheit von Wildtypvirus und auf das Vorhandensein der korrekten Zielensequenzen wie für MVA-cdvM bereits beschrieben (Abb. 26). Anschließend wurde das Wildtyp-Virus freie MVA-cdvF amplifiziert und titriert.

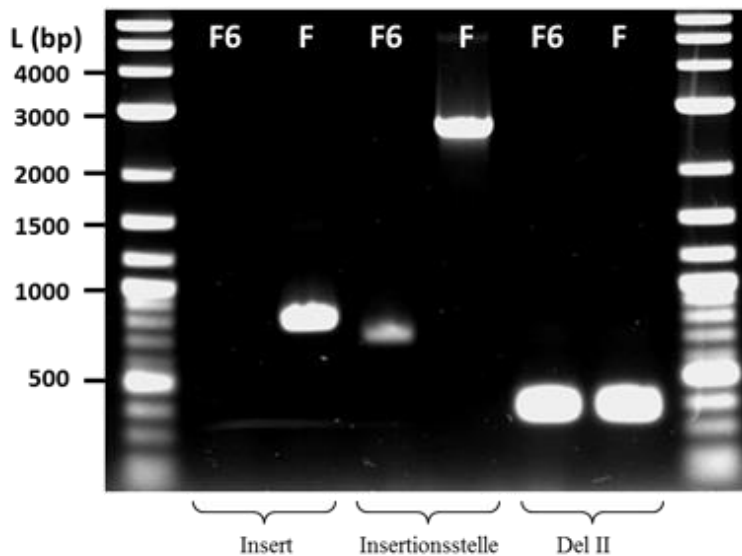


Abbildung 26: Kontrolle des rekombinanten MVA-cdvF (F) mittels PCR.

Das cdvF-Gen (Insert, 783bp) wurde im rekombinanten MVA nachgewiesen, nicht im Wildtyp-Virus (F6). Die Amplifikation des Bereichs zwischen den Flanks (Insertionsstelle) zeigt für F6 eine erwartete Bande von 542bp und für MVA-cdvF, durch die Insertion des F-Gens, eine Bande von 2596bp. Das kürzere Fragment des Wildtyp-MVA ist nicht vorhanden. Das Amplifikat (Del II) der nicht veränderten Deletionsstelle II ist bei beiden MVA gleich groß (354bp); Längenstandard NEB 2log.

Für die Transfektion-Infektion zur Generierung des MVA-cdvFH wurde, wie bei MVA-cdvF, GFP-MVA verwendet. Auch hier wurde der sogenannte *colour switch* (wie für MVA-cdvF beschrieben) genutzt.

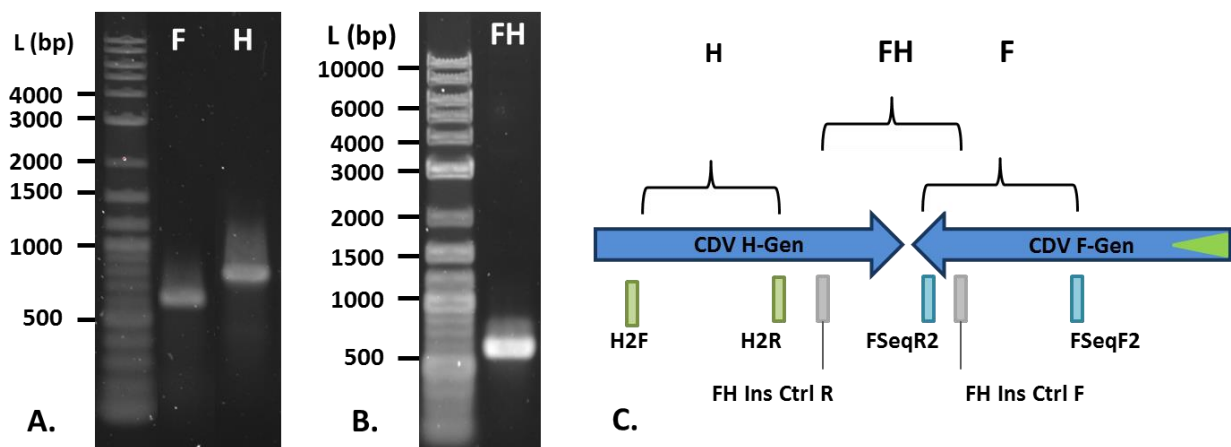


Abbildung 27: Kontrolle der Insertionen des rekombinanten MVA-cdvFH mittels PCR.

(A) Sowohl das cdvF-Gen (Insert F, 655bp) als auch das cdvH-Gen (Insert H, 815bp) wurde im rekombinanten MVA nachgewiesen; Längenstandard NEB 2log. (B) Die korrekte Lage der Zielensequenzen zueinander wurde durch Amplifikation des Fragmentes FH (641bp) nachgewiesen; Längenstandard NEB 2log. (C) Schematische Darstellung der PCR-Amplifikate zum Nachweis der Insertionen.

Nachdem das Virus durch die Aufreinigung per Plaque-Picking (rekombinantes MVA rot, Wildtyp-MVA grün) wildtyp-frei erschien, wurden auch bei diesem rekombinanten Virus spezifische PCRs durchgeführt, um die Korrektheit des Insertionen und die Freiheit von Wildtyp-Virus zu prüfen. Für ersteres wurden drei PCR-Amplifikate erstellt, die das Vorhandensein von *cdvF* und *cdvH* und deren korrekte Lage zu einander dokumentieren (siehe Abb. 27).

Zur Kontrolle der Freiheit von Wildtyp-MVAs wurde wie zuvor beschrieben der Bereich zwischen Flank und Flank repeat mittels PCR amplifiziert. Durch die Insertion von *cdvF* und *cdvH* wurde ein Fragment von ca. 4400bp nachgewiesen (Abb. 28). Eine Bande von ca. 550bp, die das Wildtyp-Virus erbringen würde, konnte nicht festgestellt werden.

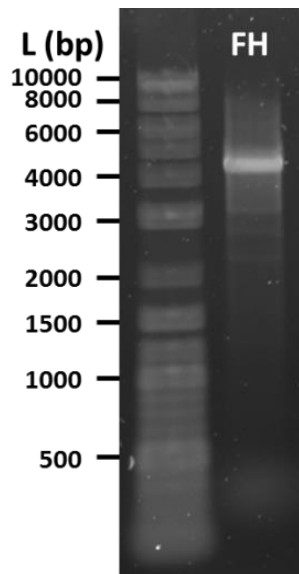


Abbildung 28: PCR-Kontrolle des rekombinanten MVA-cdvFH auf Freiheit von Wildtyp-Virus.
Die Amplifikation des Bereichs zwischen den Flanks (Insertionsstelle) zeigt eine erwartete Bande von ca. 4400bp. Das kürzere Fragment des Wildtyp-MVA (ca. 550bp) ist nicht vorhanden; Längenstandard NEB 2log.

Charakterisierung der rekombinanten Proteine nach Zellkulturinfektion

Zur Charakterisierung der Expression des Matrix-Proteins wurden DF1- und Vero-Zellen mit MVA-cdvM (MOI 5) infiziert. Zu den Zeitpunkten 0, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Infektion wurden Zelllysate angefertigt, über SDS-PAGE aufgetrennt und unter Verwendung von M-spezifischen Antikörpern im Western Blot (Abb. 29) untersucht.

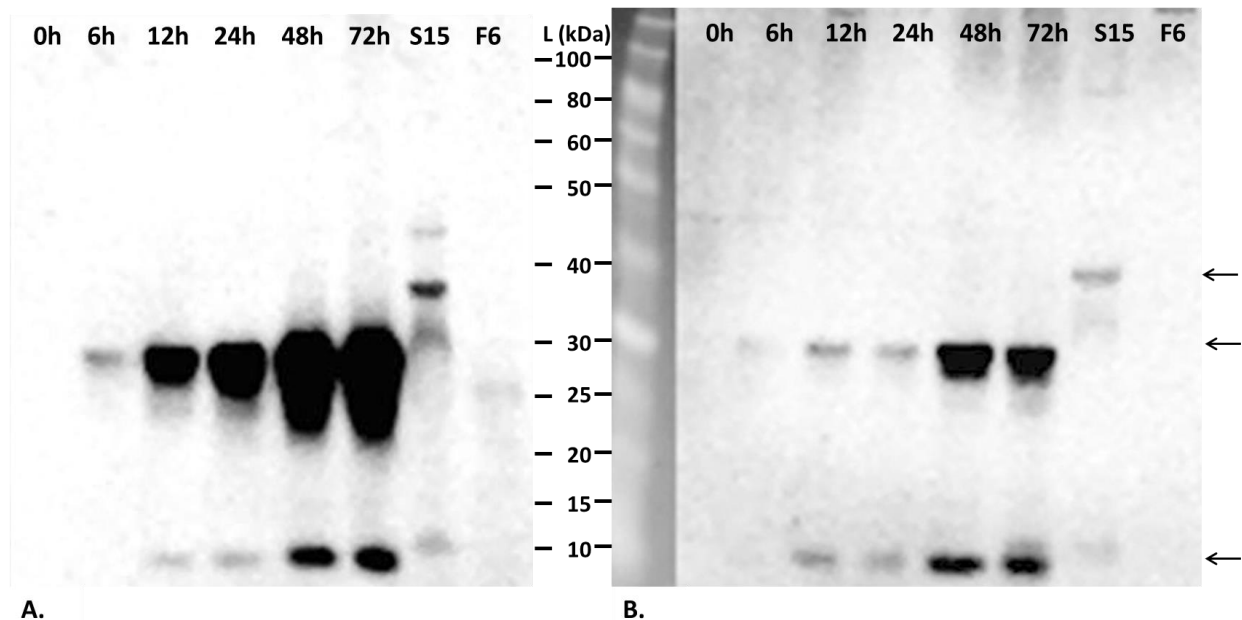


Abbildung 29: Western Blot Analyse von MVA-cdvM infizierten DF-1- (A.) und VeroDST-Zellen (B.). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (0-72hpi) wurden Proben genommen, welche mittels SDS-PAGE und Western Blots (primärer AK cdvM, 1:10.000 und mouse anti Rabbit-HRP, 1:1.000) analysiert wurden. VeroDST-Zellen, welche mit CDV-Feldvirus (S15) und nicht rekombinantem MVA (F6) infiziert wurden, dienten als Kontrollen.

In den Proben der MVA-cdvM infizierten Zellen konnten jeweils zwei spezifische Banden (ca. 30 und 10kDa) nachgewiesen werden, die in der MVA-Kontrolle (F6) nicht vorhanden waren.

In den mit Staupevirus infizierten Zellen konnte eine spezifische Bande bei ca. 38kDa beobachtet werden. Im Rahmen der Kinetikuntersuchung konnte eine deutliche Zunahme der gebildeten Proteinmenge über die Zeit beobachtet werden.

Die Charakterisierung der Expression des Fusions-Proteins erfolgte analog zu der des Matrix-Proteins. Es wurden DF1- und Vero-Zellen mit einer MOI von 5 mit MVA-cdvF infiziert. Zu den Zeitpunkten 0, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Infektion wurden Proben genommen und das M-Protein mittels Western Blot (Abb. 30) dargestellt.

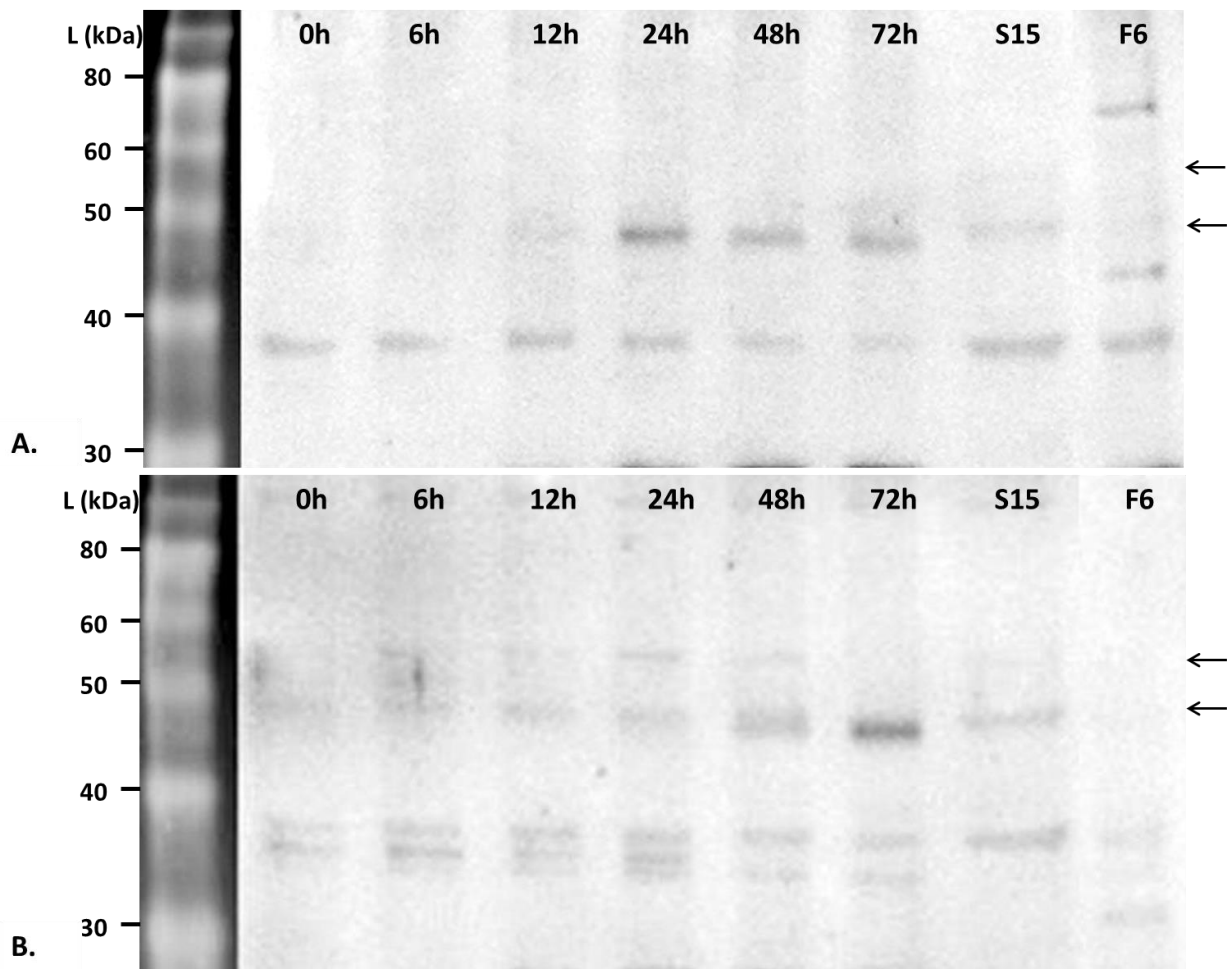


Abbildung 30: Western Blot Analyse von MVA-cdvF infizierten DF-1- (A.) und VeroDST-Zellen (B.). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (0-72hpi) wurden Proben genommen, welche mittels SDS-PAGE und Western Blot (primärer AK cdvF, 1:2.000 und Protein A-HRP, 1:8.000) analysiert wurden. VeroDST-Zellen, welche mit CDV-Feldvirus (S15) und nicht rekombinantem MVA (F6) infiziert wurden, dienten als Kontrollen.

In den Proben der MVA-cdvF infizierten DF1-Zellen konnte eine spezifische Bande (ca. 48kDa) und in den Proben der VeroDST-Zellen zwei spezifische Banden (ca. 48 und 58kDa) nachgewiesen werden, die in der MVA-Kontrolle (F6) nicht vorhanden waren. In den mit Staupevirus infizierten Zellen konnten ebenfalls zwei spezifische Banden der gleichen Größe beobachtet werden. Das 48kD Protein entspricht der erwarteten Größe des F1-Proteins, das 58kD-Protein entspricht der erwarteten Größe des F0-Proteins (Abb. 31). Das 58kDa-Protein ist in den Proben 24 und 48hpi erkennbar, nicht in der Probe 72hpi. In letzterer ist jedoch die 48 kDa Bande stärker ausgeprägt. Dies könnte auf die erwartete Furin-Spaltung des F-Vorläuferproteins hinweisen. Der verwendete primäre Antikörper bindet spezifisch an den F1-Anteil, so dass eine Darstellung des F2-Proteins im Western Blot nicht möglich ist.

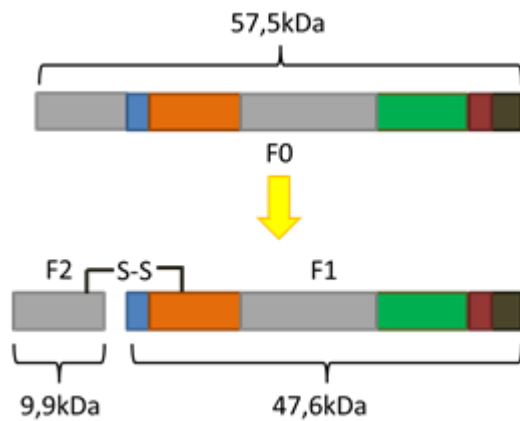


Abbildung 31: Prozessierung des CDV-Fusionsproteins (modifiziert nach Dutch et al., 2010).
Während der Proteinreifung erfolgt eine Spaltung des F-Vorläuferproteins (F0) durch das zelluläre Enzym Furin, was zur Bildung der Spaltprodukte F1 (ca. 47,6 kD) und F2 (ca. 9,9 kD) führt.

Die Proteinexpression des rekombinanten Virus MVA-cdvFH wurde im Western Blot untersucht. Hierzu wurden DF-1-Zellen infiziert und wie bereits beschrieben nach 48 Stunden beprobt. Proteinbanden, die dem Molekulargewicht der CDV-Glykoproteine entsprachen, konnten mittels Antikörperfärbung im Immunoblot nachgewiesen werden (Abb. 32).

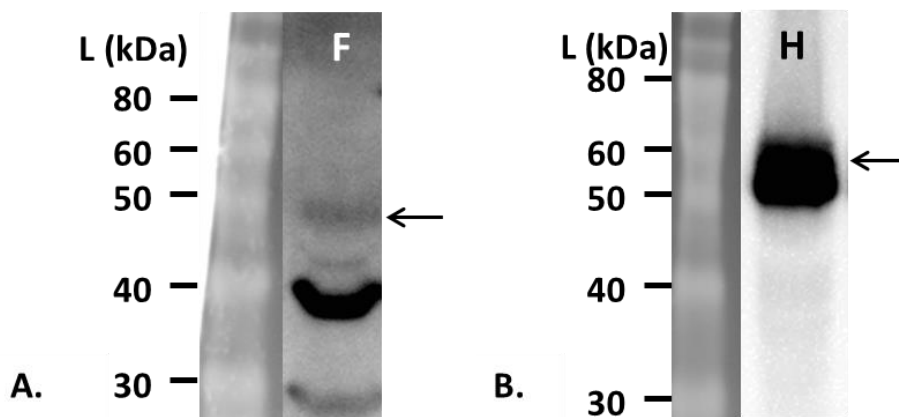


Abbildung 32: Western Blot Analyse von MVA-cdvFH infizierten DF-1Zellen.
Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blots analysiert. Zum Nachweis von cdvF (F in A., ca. 48 kDa) wurde primärer AK cdvF (1:2.000) und Protein A-HRP (1:8.000) und zum Nachweis des cdvH (H in B., ca. 60 kDa) primärer AK cdvH (1:2.000) und α Rabbit-HRP verwendet. Im Westernblot zum Nachweis von F ist zudem eine β -Actin-Kontrolle (β -Act; ca. 40kDa) zu sehen.

Da zuvor auf eine Sequenzierung verzichtet worden war, erfolgte nun dieser Kontrollschritt an gewonnenem Material des rekombinanten Virus (MVA-cdvFH). Zur Untersuchung der Gensequenz des Inserts wurden mit sechs verschiedenen Primerpaaren spezifische PCRs durchgeführt, die amplifizierte DNA Sequenzen aufgereinigt und sequenziert. Die sechs Teilsequenzen waren so gewählt worden, dass diese zu einer eindeutigen Gesamtsequenz zusammengefügt werden konnten (wie in Abbildung 14 gezeigt).

Die Glykoprotein-spezifischen Gensequenzen im Genom des rekombinanten Virus MVA-cdvFH zeigten keine Veränderungen im Vergleich zu den erwarteten Nukleotid-Sequenzen. Das Vektorvirus konnte somit als geeignetes Werkzeug für eine Fortsetzung der Arbeiten bestätigt werden.

Nachweis der genetischen Stabilität der rekombinanten Viren

Um die genetische Stabilität der rekombinanten MVA zu kontrollieren, wurden die rekombinanten Viren jeweils fünfmal mit einer MOI von 0,01 passagiert, um die Amplifikation einer größeren Menge an Virus, wie z.B. bei der Impfstoffherstellung benötigt, zu simulieren.

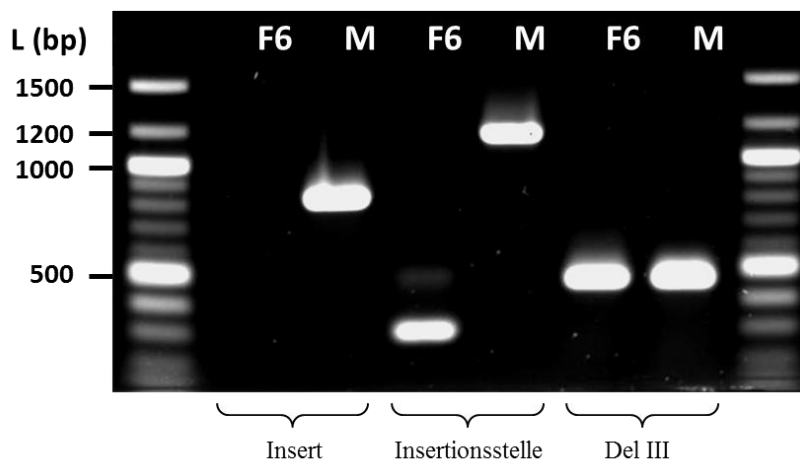


Abbildung 33: Überprüfung der genetischen Stabilität des MVA-cdvM mittels PCR.

Nach fünf Passagen (MOI 0,01) konnte das cdvM-Gen (Insert, 803bp) im rekombinanten MVA nachgewiesen werden, nicht im Wildtyp-Virus (F6). Die Amplifikation des Bereichs zwischen Flank und Promotor (Insertionsstelle) zeigt für F6 eine erwartete Bande von 109bp und für MVA-cdvM, durch die Insertion des M-Gens, eine Bande von 1130bp. Das kürzere Fragment des Wildtyp-MVA ist nicht dargestellt. Das Amplifikat (Del III) der nicht veränderten Deletionsstelle III ist bei beiden MVA gleich groß (542bp); Längenstandard NEB 1kb.

Anschließend erfolgte, ähnlich wie zuvor beschrieben, der Nachweis der im MVA-Genom eingesetzten Fremdgene durch PCR-Analyse genomischer Virus-DNA (Abb. 33 und 35) sowie die Überprüfung der Proteinexpression (Abb. 34 und 36) im Westernblot. Die hierbei für die rekombinanten Viren MVA-cdvM und MVA-cdvF erhobenen Daten unterstützten die stabile Insertion und erfolgreiche Expression der heterologen CDV-Gensequenzen.

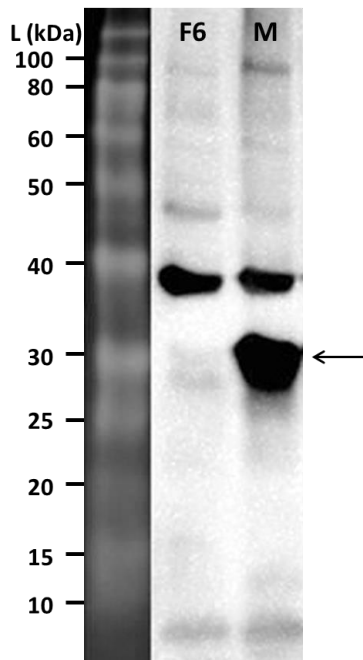


Abbildung 34: Überprüfung der Stabilität der Proteinexpression mittels Western Blot von MVA-cdvM infizierten DF1-Zellen.

Nach fünf Passagen (MOI 0,01) auf DF1-Zellen wurde ein Lysat aus infizierten DF1 Zellen (M) mittels SDS-PAGE und Western Blot (primärer AK cdvM, 1:10.000 und mouse anti Rabbit-HRP, 1:2.000) analysiert. Es zeigte sich die bereits zuvor beschriebene spezifische Bande von ca. 30kDa (M). DF1-Zellen, die mit nicht rekombinantem MVA (F6) infiziert wurden dienten als Kontrolle. β -Actin wurde Ladekontrolle verwendet (β -Act-Bande ca. 40kDa).

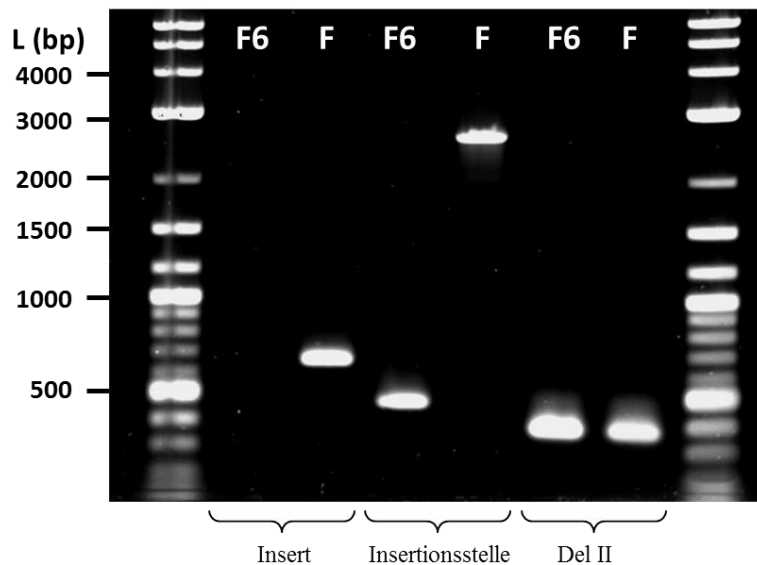


Abbildung 35: Überprüfung der genetischen Stabilität des MVA-cdvF mittels PCR.

Nach fünf Passagen (MOI 0,01) konnte das cdvF-Gen (F, Insert, 655bp) im rekombinanten MVA nachgewiesen werden, nicht im Wildtyp-Virus (F6). Die Amplifikation des Bereichs zwischen den Flanks (Insertionsstelle) zeigt für F6 ein erwartetes Produkt in der Größe von 547bp und für MVA-cdvF, durch die Insertion des F -Gens, eine Bande von 2601bp. Das kleine Amplifikationsprodukt bei der Untersuchung des Wildtyp-MVA ist nicht dargestellt. Das Amplifikat (Del II) der nicht veränderten Deletionsstelle II ist bei beiden MVA gleich groß (354bp); Längenstandard NEB 2log (L).

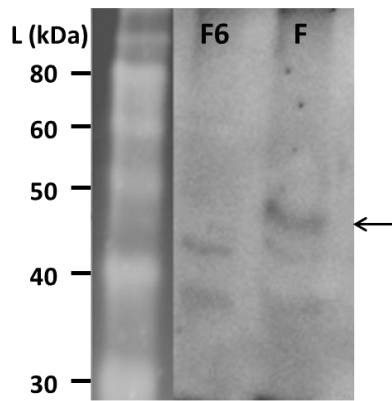


Abbildung 36: Überprüfung der Stabilität der Proteinexpression mittels Western Blot von MVA-cdvF infizierten DF1-Zellen.

Nach fünf Passagen (MOI 0,01) auf DF1-Zellen wurde ein Lysat aus infizierten DF1 Zellen (F) mittels SDS-PAGE und Western Blot (primärer AK cdvF, 1:2.000 und Protein A-HRP (1:8.000) analysiert. Es zeigte sich die erwartete spezifische Bande von ca. 48 kD. DF1-Zellen, die mit nicht rekombinantem MVA (F6) infiziert wurden dienten als Kontrolle.

Wachstumsverhalten der rekombinanten Viren

Um die Vermehrungsfähigkeit der erstellten rekombinanten Viren zu beurteilen, dienten sogenannte „Multiple-Step“-Wachstumsuntersuchungen. Hierzu wurden niedrig dosierte (MOI 0,1) Infektionen auf permissiven Zellen (DF-1 CEF), sowie auf nicht permissiven Zellen (HaCat) durchgeführt und zu bestimmten Zeitpunkten die Menge infektiöser Viren titriert. Als Kontrolle diente immer das Wildtyp-Virus MVA-F6. Die Wachstumskurven des MVA-cdvM werden in Abb. 37 und des MVA-cdvF in Abb. 38 jeweils im Vergleich zu MVA-F6 dargestellt.

Es zeigte sich, dass sich beide rekombinanten Viren, MVA-cdvM und MVA-cdvF, in permissiven Zelllinien (DF1 und CEF) genauso effizient vermehren wie das nicht-rekombinante MVA-F6. In humanen HaCat Zellen konnte dagegen mit keinem der untersuchten Viren eine produktive Vermehrung festgestellt werden.

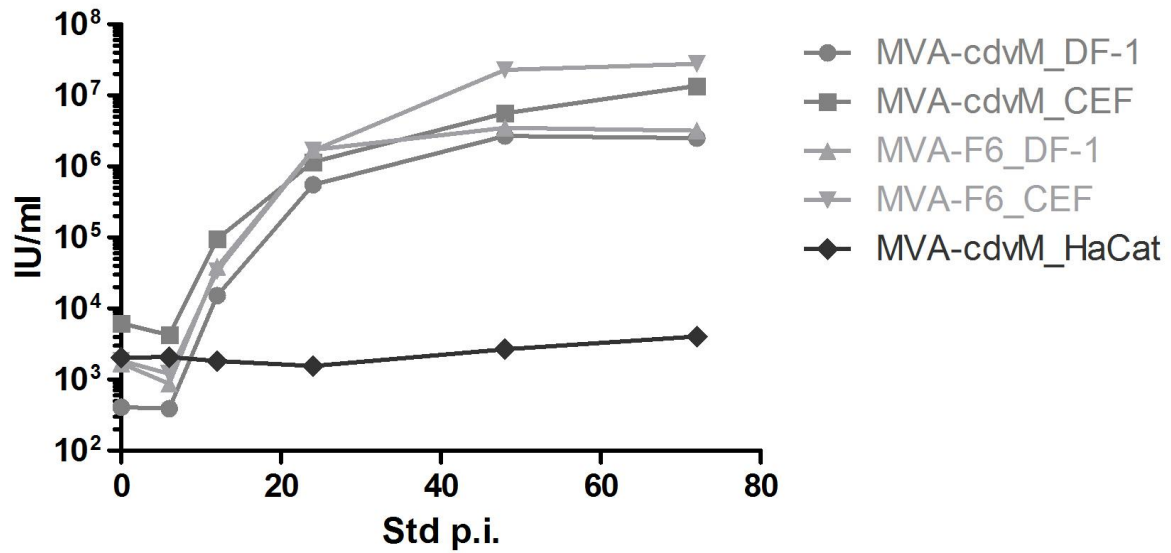


Abbildung 37: Multiple-step-Wachstumskurve des rekombinanten MVA-cdvM (MOI 0,1).
Sowohl das rekombinante MVA als auch das Wildtyp-MVA (F6) kann sich effizient in DF1- und CEF-Zellen vermehren, wohin gegen keine Replikation in humanen HaCat-Zellen stattfindet.

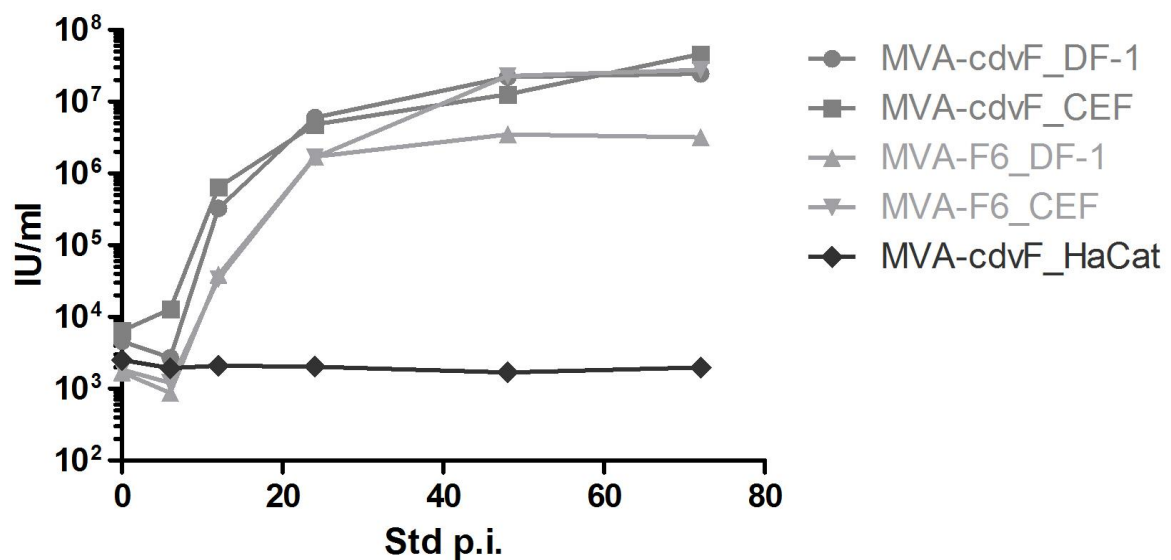


Abbildung 38: Multiple-step-Wachstumskurve des rekombinanten MVA-cdvF (MOI 0,1).
Sowohl das rekombinante MVA als auch das Wildtyp-MVA (F6) kann sich effizient in DF1- und CEF-Zellen vermehren, wohin gegen keine Replikation in humanen HaCat-Zellen stattfindet.

V. DISKUSSION

Wahl der Antigene

Der Staupevirusstamm A75/17, von dem sich die beiden verwendeten Glykoproteine ableiten, wurde 1975 aus einem Hund mit neurologischer Symptomatik isoliert (Cherpillod et al., 2000). Mehreren Studien charakterisierten dieses CDV-Isolat sowohl auf molekularer als auch immunologischer Ebene. Zudem wurde es mehrfach in Infektionsversuchen eingesetzt (Plattet et al., 2007; Rivals et al., 2007; Wenzlow et al., 2007; Plattet et al., 2005; Tipold et al., 2001; Cherpillod et al., 2000; Cherpillod et al., 1999; Tipold et al., 1999). Neurologische Symptome nach CDV-Infektion stehen bei vielen Nicht-Caniden im Vordergrund. Die Fähigkeit von CDV-Stämmen zu neuronalen Infektionen wird mit einer verringerten Fusogenität, langsamerer Replikation, reduzierter Zelllyse und der Möglichkeit zur persistierenden Infektion in Verbindung gebracht. Für A75/17 konnte gezeigt werden, dass diese Eigenschaften stammspezifisch und proteinsequenzabhängig sind und insbesondere durch das F-Protein bestimmt werden (Plattet et al., 2007; Rivals et al., 2007; Plattet et al., 2005). Dasselbe gilt in ähnlicher Form für die Vermittlung der Verbreitung des Virus über Zell-Zell-Kontakte mittels bestimmter H-Protein-Ausprägungen (Plemper et al., 2002; Messling et al., 2001; Stern et al., 1995).

Bereits Norrby et al. (1986) konnten die Induktion einer belastbaren humoralen Immunität durch die Vakzination mit aufgereinigten CDV-F- bzw. CDV-H-Proteinen zeigen. Spezifische Epitope der Glykoproteine des Staupevirus, also sowohl für das Hämagglutinin-Protein (Hirama et al., 2002) als auch für das Fusionsprotein (Ghosh et al., 2001), konnten näher charakterisiert werden. Beide Glykoproteine wurden daher bereits als Zielantigene bei der Entwicklung von Vektorvakzinen verwendet (Coke et al., 2005; Wimsatt et al., 2003; Wimsatt et al., 2001; Welter et al., 2000; Pardo et al., 1997).

Die Kombination verschiedener Antigene in einer Vakzine kann zur Ausbildung einer komplexeren und damit gegebenenfalls belastbareren Immunität führen (Perez de Val et al., 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher auch an der Expression des CDV-Matrixproteins durch das MVA-System gearbeitet. Mahapatra et al. (2006) konnten für das Virus der Pest der Kleinen Wiederkäuer (Peste-des-petits-ruminants virus, PPRV, ein mit dem CDV nahe verwandtes Morbillivirus) zeigen, dass ein rekombinantes Rinderpestvirus, welches das F- als

auch das H-Protein des PPRV enthielt, in seiner Immunogenität gegenüber dem PPRV gesteigert werden konnte, wenn zusätzlich das PPRV-Matrixprotein exprimiert wurde. Diese Daten sprechen daher auch für die Untersuchung einer trivalenten CDV-Vakzine.

Bei Morbilliviren liegt ein komplexes Zusammenspiel zwischen den beiden Glykoproteinen und dem Matrixprotein vor, wie in der Beschreibung der verwendeten Proteine in der Literaturübersicht eingehender beschrieben. Durch die Interaktion untereinander und die Sequenz der einzelnen Proteine geschieht die Regulierung des *Assembly* (Zusammenbau), des *Budding* (Knospung) und damit schließlich auch der Ausbreitung im Wirt.

Das M-Protein des Masernvirus, ebenfalls ein mit dem CDV sehr nahe verwandtes Morbillivirus, konnte als immundominantes Zielantigen für virusspezifische T-Zellen identifiziert werden (de Vries et al., 1989). Der Einsatz des CDV M-Antigens in einem neuen Impfstoff könnte daher auch für die Anregung einer CDV-spezifischen T-Zellimmunantwort vielversprechend sein.

Das M-Protein ist an der Regulierung der oben genannten verschiedenen Schritte während der Replikation maßgeblich beteiligt, wie bereits mehrfach gezeigt werden konnte (Dietzel et al., 2011; Harrison et al., 2010; Naim et al., 2000; Cathomen et al., 1998; Cathomen et al., 1998; Tahara et al., 1997; Katz et al., 1970). Die genauen Mechanismen dieser Interaktion, sowie die daran beteiligten Strukturen des M-Proteins sind noch nicht definiert. Für die vorliegende Arbeit an neuen Impfstoffkandidaten standen daher keine detaillierten Angaben über die für diese biologischen Eigenschaften verantwortlichen Sequenz- bzw. Struktur motive zur Verfügung. Für die Erstellung des MVA-cdvM wurde deshalb eine Konsensus-Sequenz verwendet, die spezifisch an die Erfordernisse der Genexpression in MVA-Vektorviren angepasst war. Kritische Bereiche in der Nukleotidsequenz, wie z.B. TTTTNT (*early stop signal*) und wiederholte GC-Abfolgen, wurden unter Beibehaltung der ursprünglichen Aminosäurekodierung mutiert und damit entfernt. Da die Sequenz des Matrix-Genes innerhalb des Genus der Morbilliviren prinzipiell gut konserviert (Mahapatra2006) ist, die Aminosäureabfolge der eingesetzten CDV-M-Konsensus-Sequenz zu zwei der verwendeten Ausgangssequenzen zu 100% identisch war sowie zu weiteren zehn der Ausgangssequenzen maximal in zwei Aminosäurepositionen Unterschiede bestanden, kann die virologische und immunologische Funktionalität des rekombinanten CDV-M-Proteins erwartet werden.

Wahl der Promotoren

Ein wichtiges Instrument bei der Entwicklung von Pockenvirus-basierten Vektorvakzinen ist die Kontrolle der Expression des Zielgens durch den Einsatz von geeigneten virus-spezifischen Promotoren. Diese Promotoren werden spezifisch nur von dem Transkriptionskomplex aus Virus-kodierter RNA-Polymerase und viralen Transkriptionsfaktoren erkannt und eine Expression (durch wirtsspezifische Transkriptionskomplexe) in nicht infizierten Zellen findet nicht statt (Moss et al., 2002). Verwendung finden unterschiedliche Promotoren wie die natürlichen Vacciniavirus-Sequenzmotive P7.5, P11 oder auch synthetische Regulatoren, deren Transkriptionsaktivität sich nicht nur über die Kopienanzahl pro Zeiteinheit, sondern auch über die Dauer der Expression definiert.

Man unterscheidet die sogenannten frühen (*early*), früh/späten (*early/late*), intermediären (*intermediate*) und späten (*late*) Promotoren. Die Transkriptionsstärke nimmt von frühen über früh/späte und schließlich späte Promotoren zu (Moss et al., 2002). Für eine angestrebte T-Zellimmunität werden traditionell bevorzugt frühe Promotoren eingesetzt (Bronte et al., 1997). Wird als Reaktion des Immunsystems auf die Impfung eine Antikörperantwort bevorzugt, entscheidet man sich meist für späte Promotoren, da hier die insgesamt produzierte Antigenmenge entscheidend für den Erhalt einer ausreichenden Immunität ist (Wyatt et al., 2007).

Der modifizierte *early/late* Promotor H5 (PmH5) ermöglicht eine starke Expression von Zielgenen und die Synthese entsprechend großer Mengen an rekombinantem Antigen bei gleichzeitigem Erhalt der Vermehrungsfähigkeit und genetischen Stabilität der rekombinanten MVA-Viren (Wang et al., 2010; Wyatt et al., 1996).

PmH5 erwies sich bei der Konstruktion der rekombinanten Viren MVA-cdvM und MVA-cdvFH als geeignetes Regulationselement zur Steuerung der rekombinanten Genexpression. Bereits nach wenigen Stunden der Infektion in der Zellkultur konnte unter Verwendung dieses Promotors eine sehr gut nachweisbare Expression der heterologen Proteine M und H beobachtet werden. In einer früheren Studie erwies sich eine starke Expression des F-Proteins des Bovinen Respiratorischen Synzytial-Virus (BRSV), einem Paramyxovirus aus dem Genus Pneumovirus, unter Kontrolle des *early/late* Promotors PmH5 als problematisch. Selbst der Einsatz des moderat starken Promotors P7.5 führte bei der Produktion des F-Antigens zu einer deutlich verringerten Vermehrungsfähigkeit und damit zu einer erhöhten genetischen Instabilität des rekombinanten MVA (Antonis et al., 2007). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Regulation der Transkription des möglicherweise ebenfalls kritischen cdvF-Gens

der ausschließlich frühe Promotor PE3L verwendet. Damit sollte einer möglicherweise ungünstigen Überexpression des CDV F Proteins vorgebeugt werden.

Erreichte Meilensteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei rekombinante MVA-Viren erstellt, deren Eigenschaften in Tabelle 13 kurz zusammengefasst sind:

Tabelle 13: rekombinante MVA-Viren

Konstrukt	Promotor	Insertionsstelle	Ausgangsplasmid	MVA-Stamm	Reporterfarbe
MVA-cdvM	PmH5	zwischen I8L & G1L	pLW73	MVA-F6 p583	grün
MVA-cdvF	PE3L	Deletion III	pMKIIIred cherry	MVA-F6-GFP	rot
MVA-cdvFH	PE3L/PmH5	Deletion III	pMKIIIred cherry	MVA-F6-GFP	rot

Bei der Erstellung des MVA-cdvM wurde ein grüner Reporterfarbstoff verwendet, der die Erkennung der rekombinanten Viren stark vereinfachte. Die so ermöglichte Sichtung farbstoffmarkierter, virusinfizierter Zellen erlaubt eine effektive klonale Aufreinigung und Anreicherung von rekombinanten Virusisolaten und bietet einen deutlichen Vorteil gegenüber typischen Selektionsverfahren unter Verwendung von Mycophenolsäure (MPA) (Drews et al., 1996) und Guaninphosphoribosyltransferase von *E. coli* (GPT) (Miller et al., 1972).

Als Weiterentwicklung kann die Verwendung eines Wildtyp-MVA angesehen werden (MVA-cdvF und MVA-cdvFH), welches seine grüne Fluoreszenz verliert, sobald durch erfolgreiche Rekombination die entsprechende Genkassette gegen ein Gen für den roten Fluoreszenzfarbstoff *Red Cherry* ausgetauscht wird. Dadurch können nicht nur mit rekombinanten MVA infizierte Zellen erkannt werden, sondern auch die Infektionsherde des Wildtyp-MVA sichtbar gemacht werden. Dieses im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Verfahren ermöglichte eine weitere Effizienzsteigerung bei der klonalen Isolierung der rekombinanten MVA-Viren bei vollständiger Eliminierung des Wildtyp-MVA. Daher führt die Benutzung von Fluoreszenzmarker insgesamt zu einer deutlich schnelleren Erstellung von rekombinanten MVA.

Die Verwendung von Expressionskassetten für verschiedene fluoreszierende Markerproteine in verschiedenen Insertionsstellen des MVA-Genoms eröffnet weiterhin die Möglichkeit, diese einfache Methode bei der Entwicklung von multivalenten rekombinanten MVA-Viren

einzusetzen, die z.B. in der Lage sind mehrere Staupevirus-Antigene gleichzeitig zu produzieren. Da die Reporterengkassetten durch weitere Passagen über einen Schritt der intragenomischen homologen Rekombination, vermittelt durch spezifisch eingesetzte DNA-Sequenzwiederholungen (*flank repeats* (FR)), deletiert werden, ist das spätere Impfstoffvirus frei von ungewollten Markerproteinen (Kremer et al., 2012).

Tabelle 14 gibt die rechnerisch ermittelten Werte (durch SMS2 - Sequence Manipulation Suite) für das Molekulargewicht der Proteine und ihre Untereinheiten, sowie Glykosilierungsstellen und die damit zu erwartende Zunahme des Molekulargewichtes. Die Glykosilierungsstellen des Fusionsproteins befinden sich in der F2-Untereinheit, die mit den in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern nicht nachgewiesen werden kann.

Tabelle 14: Zusammenfassung der erwarteten Charakteristika der rekombinanten Gene bzw. Proteine und den in dieser Arbeit beobachteten.

	cdvF		cdvH		cdvM	
	erwartet	beobachtet	erwartet	beobachtet	erwartet	beobachtet
Sequenzlänge des Genes	1989bp	1989bp	1824bp	1824bp	1008bp	1008bp
Proteinlänge	F0: 527AA F1: 439AA	NN	607AA	NN	335AA	NN
Molekulargewicht mit Glycosylierung	F0: 48kDa F1: 58kDa	F0: 48kDa F1: 58kDa	ca. 80kDa	ca. 60kDa	ca. 37,7kDa	ca. 30kDa + <10kDa

Das rekombinante MVA-cdvM, welches zuvor auf Reinheit (Freiheit von Wildtyp-Virus) getestet worden war, zeigte sich in der Kontrolle der Genomstruktur mittels PCR-Untersuchung viraler DNA bei gleichzeitiger Kontrolle der Proteinexpression mittels Western Blot als genetisch stabil und exprimierte verlässlich das rekombinante Protein.

Die Produktion des Zielproteins cdvM war bereits früh nach der Infektion sehr gut nachweisbar, ein Ergebnis, welches die besonders ausgeprägte, frühe Transkriptionsaktivität des Promotors PmH5 deutlich bestätigte (Chakrabarti et al., 1997). Die Ergebnisse der Western Blot-Untersuchungen lassen in mit MVA-cdvM infizierten CEF-Zellen die Produktion von größeren Mengen an cdvM vermuten, als in infizierten Säugerzellen (VeroDST-Zellen). Diese Beobachtung ist vermutlich nicht auf unterschiedliche Expression der rekombinanten Gensequenz zurückzuführen, sondern der Vermehrungsfähigkeit des rekombinanten MVA im CEF-Zellkultursystem geschuldet.

Im Hinblick auf das erwartete Molekulargewicht von 38kDa zeigten sich im Immunoblot für cdvM zwei spezifische Proteinbanden geringerer Größe (30kDa und <10kDa). Die Spaltung des heterologen Proteins cdvM durch proteolytische Enzyme der Wirtszelle könnte ein Grund hierfür sein. Da dieses rekombinante Protein durch eine Konsensus-Sequenz exprimiert wird, ist das Auftreten einer neuen Erkennungssequenz für eine Protease nicht auszuschließen.

Wie bei MVA-cdvM konnte auch nach klonaler Isolierung des MVA-cdvF die genetische Stabilität des Vektorvirus mittels PCR-Untersuchungen des Virusgenoms und dem spezifischen Nachweis des rekombinanten Polypeptids im Western Blot-Verfahren gezeigt werden. Die in den Western Blot-Untersuchungen nachgewiesenen Mengen an cdvF Proteinen erschienen jedoch deutlich geringer als die bei den rekombinanten Proteinen cdvH und cdvM beobachteten Quantitäten. Dafür gibt es verschiedene Erklärungsansätze.

Das Fusionsprotein des Staupevirus ist essentiell für die Infektion von Wirtszellen und für die *in vivo* Verbreitung des Erregers im Gewebe. In verschiedenen Studien konnten bereits Hinweise auf virusspezifische Unterschiede bei der Expression des cdvF und beim Ausmaß der Fusionsaktivität dieses Hüllproteins gewonnen werden.

Es konnten verschiedene Expressionsstärken nach Modifikationen im Bereich des Signalpeptids und der dort vorliegenden drei Startstellen der Translation der Fusionsgensequenz gezeigt werden (Cherpillod et al., 2004). Das von der gesamten F-Gensequenz produzierte cdvF (1989bp; Prä-F), wie in dieser Arbeit verwendet, erwies sich dagegen als ein stabileres, aber weniger fusionsaktives F-Protein (Messling et al., 2002).

Die Generierung und Aktivierung des Fusionsproteins innerhalb des sekretorischen Systems der infizierten Zelle ist sensibel gegenüber Veränderungen. So konnte gezeigt werden, dass es zu Störungen in der Glykosylierung des F-Proteins in der Zelle z.B. durch Antibiotika, wie Tunicamycin, kommen kann (Alkhatib et al., 1990; Sato et al., 1988). Dadurch kommt es zur Retention des Proteins im endoplasmatischen Retikulum (ER), da die Fusionsprotein-Vorläufer weiter an den Chaperonen (Calnexin und GRP78) gebunden sind und es zu einer verzögerten Spaltung des F0 kommt (Bolt et al., 2001; Hu et al., 1995; Watanabe et al., 1995). Dadurch kommt es zu einer Verringerung der aktiven Fusionsproteine (Meertens et al., 2003).

Außerdem wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei der MVA-vermittelten Expression des cdvF auf die Verwendung einer optimierten Kozak-Sequenz (ACC) verzichtet. Zusammen mit dem gewählten frühen, eher transkriptionsschwachen Promotor PE31, ist dies als Grund für die in den Western Blots beobachtete reduzierte Synthese von cdvF anzunehmen.

Die Möglichkeit einer Koexpression der beiden Glykoproteine cdvF und cdvH konnte mit dem rekombinanten Virus MVA-cdvFH gezeigt werden. Spezifische PCR-Analysen des viralen Genoms führten zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mit den zu erwartenden Größen für die Inserts cdvF, cdvH sowie einer überlappenden Gensequenz, die eine Insertion beider Gensequenzen in korrekter Lage erwarten lassen. Außerdem konnte auch für dieses klonal isolierte Vektorvirus die genetische Homogenität (Freiheit von Wildtyp-Virus) festgestellt werden.

Die Größe des rekombinanten Glykoproteins H auf den Immunoblots entsprach nicht der erwarteten Größe des post-translational veränderten Proteins cdvH. Das vollständig glykosylierte H-Protein besitzt ein erwartetes Molekulargewicht von 80kDa, die nicht-glykosylierte Form liegt rechnerisch bei 68kDa. Im Rahmen der durchgeführten Western Blot-Untersuchungen wurde immer ein cdvH mit reduzierter Größe nachgewiesen. Dieser Befund könnte auf eine alternative Glykosilierung in den verwendeten Zellkultursystemen zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse der Untersuchungen des Wachstums von MVA-cdvM und MVA-cdvF in der Zellkultur lassen eine unveränderte Replikationsfähigkeit der rekombinanten Viren gegenüber dem Wildtyp-MVA vermuten. Diese unveränderte Vermehrungsfähigkeit in permissiven CEF-Zellen unterstützt die prinzipielle Eignung der rekombinanten MVA für die Produktion von Impfstoffpräparationen. Außerdem konnte in den Wachstumsexperimenten die biologische Sicherheit der Viren bestätigt werden, da keines der Vektorviren zu einer produktiven Vermehrung in Säugerzellen im Stande war. Daher können die erstellten rekombinanten MVA unter Bedingungen der Sicherheitsstufe 1 nach Gentechnikgesetz und Biostoff-Verordnung verwendet werden und erfüllen damit eine sehr wünschenswerte Eigenschaft im Hinblick auf eine mögliche Verwendung als Vektorvakzine.

Weitergehende Arbeiten

Zukünftige Arbeiten zielen auf den Nachweis der Immunogenität der hier erstellten Vektoren sowie auf die Prüfung einer möglichen Schutzwirkung gegen Staupe nach Verwendung als Impfstoff im Tiermodell. Weiter könnten die hier konstruierten rekombinanten Viren MVA-cdvFH und MVA-cdvM die Grundlage für die Erstellung einer trivalenten MVA-CDV-Vektorvakzine bilden. Dies könnte unter anderem durch die Strategie der Insertion der F/H- und M-Gensequenzen in unterschiedlichen Genombereichen des MVA gefördert werden.

Hierzu zeigen Untersuchungen mit anderen Paramyxoviren (siehe Tabelle 15), dass ein rekombinantes MVA, welches zur gleichzeitigen Expression der M-, F- und H-Proteine in der Lage ist, auch die Bildung von CDV *virus-like particles* (VLPs) unterstützen könnte. Inwieweit die zusätzliche Produktion von solchen CDV-VLPs auch die Immunogenität bzw. die Wirksamkeit von MVA-CDV-Vektorimpfstoffen verbessern könnte, ist ebenfalls eine interessante Fragestellung für zukünftige Untersuchungen in einem Staupevirus-spezifischen Impf- und Infektionsmodell.

Tabelle 15: Für die Bildung von *virus like particles* benötigte virale Proteine von Paramyxoviren

Virus	Zur VLP-Bildung nötige virale Proteine	Bemerkungen	Quelle
hPIV1	M	Nukleokapsid-ähnliche Strukturen werden in VLPs eingebaut, wenn das NP-Protein exprimiert wird	Coronel et al., 1999
Sendai-Virus	M	F-Protein verstärkt VLP-Bildung, HN-Protein jedoch nicht	Takimoto et al., 2001; Sugahara et al., 2004
NDV	M	Glykoproteine und das NP-Protein können in VLP eingebaut werden, verstärken jedoch die M-getriebene VLP-Bildung nicht; der Einbau der Glykoproteine in VLPs ist effizienter, wenn beide Glykoproteine exprimiert werden	Pantua et al., 2006
PIV5	M, NP und F oder M, NP und HN	M-Protein allein führt nicht zur VLP-Bildung; F- und HN-Proteine notwendig, aber redundant	Schmitt et al., 2002
Mumpsvirus	M, NP und F	M-Protein allein führt nur zu einer sehr geringen VLP-Bildung; F-Protein verstärkt VLP-Produktion deutlich, HN-Protein jedoch nicht	Li et al., 2009
Masernvirus	M	F-Protein verstärkt die M-getriebene VLP-Produktion nicht	Pohl et al., 2007; Runkler et al., 2007
Nipah-Virus	M	Glykoproteine und N-Protein können in VLPs eingebaut werden, verstärken jedoch die M-getriebene VLP-Produktion nicht	Ciancanelli et al., 2006; Patch et al., 2007

Entgegen des Zitats von McClelland und Gillespie, 1966 (im Anschluss an die Widmung) bleibt die Staupeimpfung auch in Zeiten der modernen Virologie ein spannendes Feld.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Staupe ist eine bedeutsame, weltweit verbreitete virale Infektionskrankheit der Hunde und vieler anderer Raubtierspezies. Aufgrund ihres oft letalen Ausgangs und der fehlenden Möglichkeit zur kausalen Therapie, stellt die aktive Immunisierung empfänglicher Tiere die wichtigste prophylaktische Maßnahme dar. Bei der Impfung exotischer Tierspezies stellt sich die Verwendung von für den Hund zugelassenen, attenuierten Lebendimpfstoffen, sowie anderer experimenteller Vakzinen, problematisch dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression verschiedener Staupevirus-Antigene durch das *Modified Vaccinia Virus Ankara* (MVA) untersucht, um einen sicheren Kandidaten-Impfstoff gegen die Staupe zu erstellen. Mittels homologer Rekombination wurden die Gene des Fusionsproteins (F), des Hämagglutinin-Proteins (H) und des Matrix-Proteins (M) des Staupevirus (Canines Distemper Virus, CDV) einzeln oder in Kombination in das MVA-Genom inseriert. Durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzmarker war eine hocheffektive Aufreinigung und klonale Isolation der verschiedenen rekombinanten MVA möglich. Bei der anschließenden genetischen Charakterisierung konnte die korrekte und stabile Insertion der Fremdgene nachgewiesen werden. Bei der Expressionsanalyse der CDV-Proteine konnte eine vom gewählten Promotor abhängige Synthese beobachtet werden. Um die Kombinationsmöglichkeit verschiedener Antigene in einem MVA-Vektor zu untersuchen, wurde F/H-rekombinantes MVA erstellt, welches beide CDV-Glykoproteine zur Expression brachte. Anschließende Untersuchungen der Wachstumseigenschaften der rekombinanten MVA zeigten deren uneingeschränkte Replikationsfähigkeit in embryonalen Hühnerzellen sowie deren Replikationsdefizienz in Säugerkzellen, was zum einen für die Herstellung von Impfstoffpräparationen im großen Maßstab und zum anderen für die sichere Anwendung im zu impfenden Säuger entscheidend ist.

Es konnte gezeigt werden, dass mittels MVA-Vektorsystem eine effiziente Expression von CDV-Proteinen möglich ist, was die erstellten Konstrukte zu interessanten Kandidaten-Impfstoffen gegen Staupe macht. Weitere Untersuchungen über deren Potential zur Induktion einer protektiven Immunität im Tier sind anzustreben.

VII. SUMMARY

Canine distemper is an important infectious disease of dogs and many other carnivore species, caused by the canine distemper virus (CDV). The disease has a high mortality and causal treatment is not possible. Therefore, immunization of susceptible animals is most important. However, vaccination of exotic species with licensed attenuated live vaccines or other experimental vaccines frequently poses a problem.

Here, expression of different CDV antigens using the poxvirus Modified Vaccinia virus Ankara (MVA) was investigated in order to create a safe vaccine candidate against canine distemper. The genes of the fusion protein (F), the hemagglutinin protein (H) and the matrix protein (M) of CDV were inserted into MVA genome by homologous recombination. Highly efficient purification and isolation of the recombinant MVA was performed using different fluorescent markers. The subsequent genetic characterization showed a correct and stable insertion of the genes of interest. Depending on the used viral promoter, expression of the CDV genes and synthesis of the antigens was detected. To determine the possibility of the combination of different antigens in a single MVA vector, an F/H-recombinant MVA was generated, which expressed both glycoproteins of the canine distemper virus. Subsequent screening of the growth characteristics of the recombinant MVA demonstrated their high replication capability in embryonic chicken cells, as well as their replication deficiency in mammalian cells. This is important for large-scale production of vaccines and for the safe vaccination of mammals.

Using the MVA as vector platform, an efficient expression of CDV proteins could be demonstrated. The generated recombinant MVA might be interesting vaccine candidates against canine distemper. Therefore, further *in vivo* studies are necessary to investigate the capacity of the recombinant MVA to induce protective and safe immune response.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abdullah H, Brankin B, Brady C, Cosby SL. Wild-type measles virus infection upregulates poliovirus receptor-related 4 and causes apoptosis in brain endothelial cells by induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. Jul 2013;72(7):681-696.

Ader N, Brindley M, Avila M, et al. Mechanism for active membrane fusion triggering by morbillivirus attachment protein. *Journal of virology*. Jan 2013;87(1):314-326.

Ader N, Brindley MA, Avila M, et al. Structural rearrangements of the central region of the morbillivirus attachment protein stalk domain trigger F protein refolding for membrane fusion. *The Journal of biological chemistry*. May 11 2012;287(20):16324-16334.

Akerstedt J, Lillehaug A, Larsen IL, Eide NE, Arnemo JM, Handeland K. Serosurvey for canine distemper virus, canine adenovirus, *Leptospira interrogans*, and *Toxoplasma gondii* in free-ranging canids in Scandinavia and Svalbard. *Journal of wildlife diseases*. Apr 2010;46(2):474-480.

Alexander KA, Appel MJ. African wild dogs (*Lycaon pictus*) endangered by a canine distemper epizootic among domestic dogs near the Masai Mara National Reserve, Kenya. *Journal of wildlife diseases*. Oct 1994;30(4):481-485.

Alkhatib G, Richardson C, Shen SH. Intracellular processing, glycosylation, and cell-surface expression of the measles virus fusion protein (F) encoded by a recombinant adenovirus. *Virology*. Mar 1990;175(1):262-270.

An DJ, Yoon SH, Park JY, No IS, Park BK. Phylogenetic characterization of canine distemper virus isolates from naturally infected dogs and a marten in Korea. *Veterinary microbiology*. Dec 10 2008;132(3-4):389-395.

Anderson DE, von Messling V. Region between the canine distemper virus M and F genes modulates virulence by controlling fusion protein expression. *Journal of virology*. Nov 2008;82(21):10510-10518.

Antoine G, Scheifflinger F, Dorner F, Falkner FG. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*. May 10 1998;244(2):365-396.

Antonis AF, van der Most RG, Suezer Y, et al. Vaccination with recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing bovine respiratory syncytial virus (bRSV) proteins protects calves against RSV challenge. *Vaccine*. Jun 15 2007;25(25):4818-4827.

Appel MJ, Reggiardo C, Summers BA, et al. Canine distemper virus infection and encephalitis in javelinas (collared peccaries). *Arch Virol*. 1991;119(1-2):147-152.

Appel MJ, Shek WR, Shesberadaran H, Norrby E. Measles virus and inactivated canine distemper virus induce incomplete immunity to canine distemper. *Arch Virol*. 1984;82(1-2):73-82.

Appel MJ, Summers BA. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Veterinary microbiology*. May 1995;44(2-4):187-191.

Appel MJ. Pathogenesis of canine distemper. *American journal of veterinary research*. Jul 1969;30(7):1167-1182.

Appel MJG, Yates RA, Foley GL, et al. Canine Distemper Epizootic in Lions, Tigers, and Leopards in North America. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1994;6(3):277-288.

Appel MJG. Reversion to Virulence of Attenuated Canine Distemper Virus In Vivo and In Vitro. *J. gen. Virol*. 1978(41):385-393.

Appel MJGaG, J.H. . Canine Distemper Virus. Vol 11. New York - Wien: Springer; 1972.

Appel MJGG, J. M. Canine distemper virus in domesticated cats and pigs. *Am. J. Vet. Res*. 1974;35(6):803-806.

Axthelm MK, Krakowka S. Canine distemper virus: the early blood-brain barrier lesion. *Acta neuropathologica*. 1987;75(1):27-33.

Bae CW, Lee JB, Park SY, et al. Deduced sequences of the membrane fusion and attachment proteins of canine distemper viruses isolated from dogs and wild animals in Korea. *Virus genes*. Apr 27 2013.

Bakari M, Aboud S, Nilsson C, et al. Broad and potent immune responses to a low dose intradermal HIV-1 DNA boosted with HIV-1 recombinant MVA among healthy adults in Tanzania. *Vaccine*. Oct 26 2011;29(46):8417-8428.

Balamurugan V, Sen A, Venkatesan G, et al. Peste des petits ruminants virus detected in tissues from an Asiatic lion (*Panthera leo persica*) belongs to Asian lineage IV. *Journal of Veterinary*

Science. 2012;13(2):203.

Barreto ML, Teixeira MG, Carmo EH. Infectious diseases epidemiology. Journal of epidemiology and community health. Mar 2006;60(3):192-195.

Barrett T, Wohlsein P, Bidewell CA, Rowell SF. Canine distemper virus in a Californian sea lion (*Zalophus californianus*). The Veterinary record. Mar 13 2004;154(11):334-336.

Barrett T. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. Veterinary microbiology. Sep 1 1999;69(1-2):3-13.

Battisti AJ, Meng G, Winkler DC, et al. Structure and assembly of a paramyxovirus matrix protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Aug 28 2012;109(35):13996-14000.

Behbehani AM. The smallpox story: life and death of an old disease. Microbiological reviews. Dec 1983;47(4):455-509.

Benetka V, Leschnik M, Affenzeller N, Mostl K. Phylogenetic analysis of Austrian canine distemper virus strains from clinical samples from dogs and wild carnivores. The Veterinary record. Apr 9 2011;168(14):377.

Bestetti G, Fatzer R, Frankhauser R. Encephalitis following vaccination against distemper and infectious hepatitis in the dog. An optical and ultrastructural study. Acta neuropathologica. Aug 7 1978;43(1-2):69-75.

Bieringer M, Han JW, Kendl S, Khosravi M, Plattet P, Schneider-Schaulies J. Experimental adaptation of wild-type canine distemper virus (CDV) to the human entry receptor CD150. PloS one. 2013;8(3):e57488.

Billinis C, Athanasiou LV, Valiakos G, Mamuris Z, Birtsas P, Spyrou V. Phylogenetic analysis of canine distemper viruses from red foxes, Greece. The Veterinary record. Jul 2 2013.

Bisht H, Roberts A, Vogel L, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Apr 27 2004;101(17):6641-6646.

Black-footed Ferret Recovery Implementation Team. www.blackfootedferret.org. 2013.

Blaine D. Canine Pathology. a full description of the diseases of dogs. London: T. Boosey; 1817.

Blancou J. Dog distemper: imported into Europe from South America? *Historia medicinae veterinariae*. 2004;29(2):35-41.

Blixenkrone-Møller M, Svansson V, Appel M, Krogsrud J, Have P, Örvell C. Antigenic relationships between field isolates of morbilliviruses from different carnivores. *Arch Virol*. 1992;123(3-4):279-294.

Blixenkrone-Møller M, Svansson V, Have P, Botner A, Nielsen J. Infection studies in mink with seal-derived morbillivirus. *Arch Virol*. 1989;106(1-2):165-170.

Blixenkrone-Møller M, Svansson V, Have P, et al. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. *Veterinary microbiology*. Oct 1993;37(1-2):163-173.

Blixenkrone-Møller M, Svansson V, Örvell C, Have P. Phocid distemper virus--a threat to terrestrial mammals? *The Veterinary record*. Sep 8 1990;127(10):263-264.

Blythe LL, Schmitz JA, Roelke M, Skinner S. Chronic encephalomyelitis caused by canine distemper virus in a Bengal tiger. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Dec 1 1983;183(11):1159-1162.

Böhm M, Thompson H, Weir A, Hasted AM, Maxwell NS, Herrtage ME. Serum antibody titres to canine parvovirus, adenovirus and distemper virus in dogs in the UK which had not been vaccinated for at least three years. *The Veterinary record*. Apr 10 2004;154(15):457-463.

Bohm J, Blixenkrone-Møller M, Lund E. A serious outbreak of canine distemper among sled-dogs in northern Greenland. *Arctic medical research*. Oct 1989;48(4):195-203.

Bolt G. The measles virus (MV) glycoproteins interact with cellular chaperones in the endoplasmic reticulum and MV infection upregulates chaperone expression. *Arch Virol*. 2001;146(11):2055-2068.

Bolt G, Jensen TD, Gottschalck E, et al. Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus. *The Journal of general virology*. Feb 1997;78 (Pt 2):367-372.

Bonami F, Rudd PA, von Messling V. Disease duration determines canine distemper virus neurovirulence. *Journal of virology*. Nov 2007;81(21):12066-12070.

Bowden TA, Jones EY, Stuart DI. Cells under siege: viral glycoprotein interactions at the cell surface. *Journal of structural biology*. Aug 2011;175(2):120-126.

Brewoo JN, Powell TD, Stinchcomb DT, Osorio JE. Efficacy and safety of a modified vaccinia Ankara (MVA) vectored plague vaccine in mice. *Vaccine*. Aug 16 2010;28(36):5891-5899.

Brindley MA, Takeda M, Plattet P, Plemper RK. Triggering the measles virus membrane fusion machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Oct 30 2012;109(44):E3018-3027.

Bronson E, Deem SL, Sanchez C, Murray S. Serologic response to a canarypox-vectored canine distemper virus vaccine in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*. Jun 2007;38(2):363-366.

Bronte V, Carroll MW, Goletz TJ, et al. Antigen expression by dendritic cells correlates with the therapeutic effectiveness of a model recombinant poxvirus tumor vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Apr 1 1997;94(7):3183-3188.

Brun A, Albina E, Barret T, et al. Antigen delivery systems for veterinary vaccine development. *Viral-vector based delivery systems. Vaccine*. Dec 2 2008;26(51):6508-6528.

Bush M, Montali RJ, Brownstein D, James AE, Jr., Appel MJ. Vaccine-induced canine distemper in a lesser panda. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Nov 1 1976;169(9):959-960.

Butina TV, Denikina NN, Belikov SI. Canine distemper virus diversity in Lake Baikal seal (*Phoca sibirica*) population. *Veterinary microbiology*. Jul 29 2010;144(1-2):192-197.

Carpenter JW, Appel MJ, Erickson RC, Novilla MN. Fatal vaccine-induced canine distemper virus infection in black-footed ferrets. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Nov 1 1976;169(9):961-964.

Carpenter MA, Appel MJ, Roelke-Parker ME, et al. Genetic characterization of canine distemper virus in Serengeti carnivores. *Vet Immunol Immunopathol*. Oct 23 1998;65(2-4):259-266.

Carre H. Sur la maladie des jeunes chiens. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences*. 1905(140):689-690, 1489-1491.

Cathomen T, Mrkic B, Spehner D, et al. A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *The EMBO journal*. Jul 15

1998;17(14):3899-3908.

Cathomen T, Naim HY, Cattaneo R. Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence. *Journal of virology*. Feb 1998;72(2):1224-1234.

Cha SY, Kim EJ, Kang M, Jang SH, Lee HB, Jang HK. Epidemiology of canine distemper virus in wild raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) from South Korea. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. Sep 2012;35(5):497-504.

Chakrabarti S, Sisler JR, Moss B. Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression. *BioTechniques*. Dec 1997;23(6):1094-1097.

Chalmers WS, Baxendale W. A comparison of canine distemper vaccine and measles vaccine for the prevention of canine distemper in young puppies. *The Veterinary record*. Oct 8 1994;135(15):349-353.

Chandra AM, Ginn PE, Terrell SP, et al. Canine distemper virus infection in binturongs (*Arctictis binturong*). *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* Jan 2000;12(1):88-91.

Chandran D, Reddy KB, Vijayan SP, et al. MVA recombinants expressing the fusion and hemagglutinin genes of PPRV protects goats against virulent challenge. *Indian journal of microbiology*. Sep 2010;50(3):266-274.

Chandran D, Shahana PV, Rani GS, Sugumar P, Shankar CR, Srinivasan VA. Display of neutralizing epitopes of Canine parvovirus and a T-cell epitope of the fusion protein of Canine distemper virus on chimeric tymovirus-like particles and its use as a vaccine candidate both against Canine parvo and Canine distemper. *Vaccine*. Dec 10 2009;28(1):132-139.

Chang A, Dutch RE. Paramyxovirus fusion and entry: multiple paths to a common end. *Viruses*. Apr 2012;4(4):613-636.

Chappuis G. Control of canine distemper. *Veterinary microbiology*. May 1995;44(2-4):351-358.

Chen CC, Pei KJ, Liao MH, Mortenson JA. Canine distemper virus in wild ferret-badgers of Taiwan. *Journal of wildlife diseases*. Apr 2008;44(2):440-445.

Ciancanelli MJ, Basler CF. Mutation of YMYL in the Nipah virus matrix protein abrogates budding and alters subcellular localization. *Journal of virology*. Dec 2006;80(24):12070-12078.

Coke RL, Backues KA, Hoover JP, Saliki JT, Ritchey JW, West GD. Serologic Responses after Vaccination of Fennec Foxes (*Vulpes Zerda*) and Meerkats (*Suricata Suricatta*) with a Live, Canarypox-Vectored Canine Distemper Virus Vaccine. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2005;36(2):326-330.

Cornwell HJ, Thompson H, McCandlish IA, Macartney L, Nash AS. Encephalitis in dogs associated with a batch of canine distemper (Rockborn) vaccine. *The Veterinary record*. Jan 16 1988;122(3):54-59.

Coronel EC, Murti KG, Takimoto T, Portner A. Human parainfluenza virus type 1 matrix and nucleoprotein genes transiently expressed in mammalian cells induce the release of virus-like particles containing nucleocapsid-like structures. *Journal of virology*. Aug 1999;73(8):7035-7038.

Cottingham MG, Carroll MW. Recombinant MVA vaccines: dispelling the myths. *Vaccine*. Mar 21 2013.

Cottrell WO, Keel MK, Brooks JW, Mead DG, Phillips JE. First Report of Clinical Disease Associated with Canine Distemper Virus Infection in a Wild Black Bear (*Ursus americana*). *Journal of wildlife diseases*. Oct 2013;49(4):1024-1027.

Cranfield MR, Barker IK, Mehren KG, Rapley WA. Canine Distemper in Wild Raccoons (*Procyon lotor*) at the Metropolitan Toronto Zoo. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne*. Feb 1984;25(2):63-66.

Curran MD, Clarke DK, Rima BK. The nucleotide sequence of the gene encoding the attachment protein H of canine distemper virus. *The Journal of general virology*. Feb 1991;72 (Pt 2):443-447.

Currier JR, Ngaui V, de Souza MS, et al. Phase I safety and immunogenicity evaluation of MVA-CMDR, a multigenic, recombinant modified vaccinia Ankara-HIV-1 vaccine candidate. *PloS one*. 2010;5(11):e13983.

Dalldorf G, Douglass M, Robinson HE. Canine Distemper in the Rhesus Monkey (*Macaca Mulatta*). *The Journal of experimental medicine*. Jan 31 1938;67(2):323-332.

Damien BC, Martina BE, Losch S, Mossong J, Osterhaus AD, Muller CP. Prevalence of antibodies against canine distemper virus among red foxes in Luxembourg. *Journal of wildlife diseases*. Oct 2002;38(4):856-859.

- Daoust PY, McBurney SR, Godson DL, van de Bildt MW, Osterhaus AD. Canine distemper virus-associated encephalitis in free-living lynx (*Lynx canadensis*) and bobcats (*Lynx rufus*) of eastern Canada. *Journal of wildlife diseases*. Jul 2009;45(3):611-624.
- Davidson WR, Appel MJ, Doster GL, Baker OE, Brown JF. Diseases and parasites of red foxes, gray foxes, and coyotes from commercial sources selling to fox-chasing enclosures. *Journal of wildlife diseases*. Oct 1992;28(4):581-589.
- Davidson WR, Nettles VF, Hayes LE, Howerth EW, Couvillion CE. Diseases diagnosed in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from the southeastern United States. *Journal of wildlife diseases*. Jan 1992;28(1):28-33.
- De Guise S, Jay Levin M. Cetacean-reconstituted severe combined immunodeficient (SCID) mice respond to vaccination with canine distemper vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2004;97(3-4):177-186.
- de Swart RL, Ludlow M, de Witte L, et al. Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS pathogens*. Nov 2007;3(11):e178.
- de Ulloa AJ, J. relacion historica del viage a la america meridional. Vol 1. Madrid 1748.
- de Vries RD, Ludlow M, Verburgh RJ, et al. Measles Vaccination of Non-Human Primates Provides Partial Protection against Infection with Canine Distemper Virus. *Journal of virology*. Feb 5 2014.
- de Vries RD, Lemon K, Ludlow M, et al. In vivo tropism of attenuated and pathogenic measles virus expressing green fluorescent protein in macaques. *Journal of virology*. May 2010;84(9):4714-4724.
- de Vries P, Versteeg-van Oosten JP, Visser IK, et al. Measles virus-specific murine T cell clones: characterization of fine specificity and function. *J Immunol*. Apr 15 1989;142(8):2841-2846.
- Demeter Z, Palade EA, Hornyak A, Rusvai M. Controversial results of the genetic analysis of a canine distemper vaccine strain. *Veterinary microbiology*. May 19 2010;142(3-4):420-426.
- Denzin N, Herwig V, van der Grinten E. Occurrence and geographical distribution of Canine Distemper Virus infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) of Saxony-Anhalt, Germany. *Veterinary microbiology*. Feb 22 2013;162(1):214-218.

Dietzel E, Anderson DE, Castan A, von Messling V, Maisner A. Canine distemper virus matrix protein influences particle infectivity, particle composition, and envelope distribution in polarized epithelial cells and modulates virulence. *J of virology*. Jul 2011;85(14):7162-7168.

Di Sabatino D, Lorusso A, Di Francesco CE, et al. Arctic Lineage-Canine Distemper Virus as a Cause of Death in Apennine Wolves (*Canis lupus*) in Italy. *PloS one*. Jan 20 2014;9(1):e82356.

Diters RW, Nielsen SW. Toxoplasmosis, distemper, and herpesvirus infection in a skunk (*Mephitis mephitis*). *Journal of wildlife diseases*. Jan 1978;14(1):132-136.

Dorrell L, O'Callaghan CA, Britton W, et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara efficiently restimulates human cytotoxic T lymphocytes in vitro. *Vaccine*. Sep 15 2000;19(2-3):327-336.

Draper SJ, Cottingham MG, Gilbert SC. Utilizing poxviral vectored vaccines for antibody induction-Progress and prospects. *Vaccine*. Jun 5 2013.

Drews RE, Kolker MT, Sachar DS, Moran CP, Schnipper LE. Passage to nonselective media transiently alters growth of mycophenolic acid-resistant mammalian cells expressing the *escherichia coli* xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene: implications for sequential selection strategies. *Analytical biochemistry*. Mar 15 1996;235(2):215-226.

Drexler I, Heller K, Wahren B, Erfle V, Sutter G. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *The Journal of general virology*. Feb 1998;79 (Pt 2):347-352.

Drexler I, Staib C, Sutter G. Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential? *Current opinion in biotechnology*. Dec 2004;15(6):506-512.

Dutch RE. Entry and fusion of emerging paramyxoviruses. *PLoS pathogens*. 2010;6(6):e1000881.

Ek-Kommonen C, Rudback E, Anttila M, Aho M, Huovilainen A. Canine distemper of vaccine origin in European mink, *Mustela lutreola*--a case report. *Veterinary microbiology*. Apr 2 2003;92(3):289-293.

Ek-Kommonen C, Sihvonen L, Pekkanen K, Rikula U, Nuotio L. Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *The Veterinary record*. Oct 11 1997;141(15):380-383.

- Elia G, Decaro N, Martella V, et al. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *Journal of virological methods*. Sep 2006;136(1-2):171-176.
- Engelhardt P, Wyder M, Zurbriggen A, Grone A. Canine distemper virus associated proliferation of canine footpad keratinocytes in vitro. *Veterinary microbiology*. Apr 25 2005;107(1-2):1-12.
- Esposito J, Brechling K, Baer G, Moss B. Vaccinia virus recombinants expressing rabiesvirus glycoprotein protect against rabies. *Virus genes*. Nov 1987;1(1):7-21.
- Esteban M. Attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC as promising vaccine candidates against HIV/AIDS. *Human vaccines*. Dec 2009;5(12):867-871.
- Ferreira CS, Frenzke M, Leonard VH, Welstead GG, Richardson CD, Cattaneo R. Measles virus infection of alveolar macrophages and dendritic cells precedes spread to lymphatic organs in transgenic mice expressing human signaling lymphocytic activation molecule (SLAM, CD150). *Journal of virology*. Mar 2010;84(6):3033-3042.
- Ferreira H, Calderon MG, Marticorena D, Marull C, Leonardo BC. Canine distemper infection in crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from Argentina. *Journal of wildlife diseases*. Oct 2009;45(4):1158-1162.
- Ferry NS. *Bacillus bronchisepticus* (bronchicanis); the cause of distemper in dogs and similar disease in other animals. *Vet. J.* 1912;68:376-391.
- Fix ASR, D. P.; Hill H. T.; Gill M. A.; Evans, M. B. Feline panleukopenia virus and subsequent canine distemper virus infection in two snow leopards (*Panthera uncia*). *Journal of zoo and wildlife medicine: official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*. 1989;20(3):273-281.
- Fleming G. *ANIMAL PLAGUES: HISTORY, NATURE, AND PREVENTION*. 1871.
- Forsyth MA, Kennedy S, Wilson S, Eybatov T, Barrett T. Canine distemper virus in a Caspian seal. *The Veterinary record*. Dec 12 1998;143(24):662-664.
- Frölich K, Czupalla O, Haas L, Hentschke J, Dedek J, Fickel J. Epizootiological investigations of canine distemper virus in free-ranging carnivores from Germany. *Veterinary microbiology*. Jun 12 2000;74(4):283-292.
- Fromm Bros. Historical Preservation Society I. www.frommhistory.org. 2013.

- Fujita K, Miura R, Yoneda M, et al. Host range and receptor utilization of canine distemper virus analyzed by recombinant viruses: Involvement of heparin-like molecule in CDV infection. *Virology*. Mar 15 2007;359(2):324-335.
- Gemma T, Watari T, Akiyama K, et al. Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo area. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. Jun 1996;58(6):547-550.
- Ghosh S, Walker J, Jackson DC. Identification of canine helper T-cell epitopes from the fusion protein of canine distemper virus. *Immunology*. Sep 2001;104(1):58-66.
- Giannitti F, Diab SS, Uzal FA, et al. Infection with a Hepatozoon sp. closely related to *Hepatozoon felis* in a wild Pampas gray fox (*Lycalopex -Pseudalopex -gymnocercus*) co-infected with canine distemper virus. *Veterinary parasitology*. May 25 2012;186(3-4):497-502.
- Gilbert SC. Clinical development of Modified Vaccinia virus Ankara vaccines. *Vaccine*. Mar 21 2013.
- Gill JM, Hartley WJ, Hodgkinson NL. An outbreak of post-vaccinal suspected distemper-like encephalitis in farmed ferrets (*Mustela putorius furo*). *New Zealand veterinary journal*. Dec 1988;36(4):173-176.
- Goller KV, Fyumagwa RD, Nikolin V, et al. Fatal canine distemper infection in a pack of African wild dogs in the Serengeti ecosystem, Tanzania. *Veterinary microbiology*. Dec 15 2010;146(3-4):245-252.
- Goodbourn S, Randall RE. The regulation of type I interferon production by paramyxoviruses. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. Sep 2009;29(9):539-547.
- Goodrich JM, Williams ES, Buskirk SW. Effects of a modified-live virus canine distemper vaccine on captive badgers (*Taxidea taxus*). *Journal of wildlife diseases*. Oct 1994;30(4):492-496.
- Gowtage-Sequeira S, Banyard AC, Barrett T, Buczkowski H, Funk SM, Cleaveland S. Epidemiology, pathology, and genetic analysis of a canine distemper epidemic in Namibia. *Journal of wildlife diseases*. Oct 2009;45(4):1008-1020.
- Grachev MAK, V. P.; Mamaev, L. V.; Zorin, V. L.; Baranova, L. V.; Denikina, N. N.; Belikov, S. I.; Petrov, E. A. Distemper virus in Baikal seals. *Nature*. Mar 16 1989;338(6212):209-210.

Green RG, Stulberg CS. Distemperoid Virus Interference in Canine Distemper. *Science*. Apr 26 1946;103(2678):497-498.

Gröne A, Groeters S, Koutinas A, Saridomichelakis M, Baumgärtner W. Non-cytocidal infection of keratinocytes by canine distemper virus in the so-called hard pad disease of canine distemper. *Veterinary microbiology*. 2003;96(2):157-163.

Guo L, Yang SL, Wang CD, et al. Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from giant panda and raccoon dogs in China. *Virology journal*. 2013;10:109.

Haas L, Hofer H, East M, Wohlsein P, Liess B, Barrett T. Canine distemper virus infection in Serengeti spotted hyenas. *Veterinary microbiology*. Mar 1996;49(1-2):147-152.

Haig DA. Canine distemper-immunization with avianised virus. *Onderstepoort J Vet Res*. 1956;27:19-53.

Halbrooks RD, Swango LJ, Schnurrenberger PR, Mitchell FE, Hill EP. Response of gray foxes to modified live-virus canine distemper vaccines. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Dec 1 1981;179(11):1170-1174.

Hammer AS, Dietz HH, Andersen TH, Nielsen L, Blixenkrone-Møller M. Distemper virus as a cause of central nervous disease and death in badgers (*Meles meles*) in Denmark. *The Veterinary record*. Apr 24 2004;154(17):527-530.

Harder TC, Kenter M, Appel MJ, Roelke-Parker ME, Barrett T, Osterhaus AD. Phylogenetic evidence of canine distemper virus in Serengeti's lions. *Vaccine*. Apr 1995;13(6):521-523.

Harder TC, Kenter M, Vos H, et al. Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships. *The Journal of general virology*. Mar 1996;77 (Pt 3):397-405.

Harder TC, Osterhaus AD. Canine distemper virus--a morbillivirus in search of new hosts? *Trends in microbiology*. Mar 1997;5(3):120-124.

Harrison MS, Sakaguchi T, Schmitt AP. Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *The international journal of biochemistry & cell biology*. Sep 2010;42(9):1416-1429.

Harrop R, Chu F, Gabrail N, Srinivas S, Blount D, Ferrari A. Vaccination of castration-resistant prostate cancer patients with TroVax (MVA-5T4) in combination with docetaxel: a

randomized phase II trial. Cancer immunology, immunotherapy: CII. Jul 23 2013.

Hartley WJ. A post-vaccinal inclusion body encephalitis in dogs. Vet Pathol. 1974;11(4):301-312.

Hashiguchi T, Kajikawa M, Maita N, et al. Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Dec 4 2007;104(49):19535-19540.

Hashimoto K, Ono N, Tatsuo H, et al. SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. Journal of virology. Jul 2002;76(13):6743-6749.

Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. Emerging infectious diseases. Dec 2002;8(12):1468-1473.

Henderson DA, Fenner F. Recent events and observations pertaining to smallpox virus destruction in 2002. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. Oct 1 2001;33(7):1057-1059.

Hessel A, Schwendinger M, Holzer GW, et al. Vectors based on modified vaccinia Ankara expressing influenza H5N1 hemagglutinin induce substantial cross-clade protective immunity. PloS one. 2011;6(1):e16247.

Hirama K, Goto Y, Uema M, Endo Y, Miura R, Kai C. Phylogenetic analysis of the hemagglutinin (H) gene of canine distemper viruses isolated from wild masked palm civets (*Paguma larvata*). The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science. Dec 2004;66(12):1575-1578.

Hirama K, Togashi K, Wakasa C, et al. Cytotoxic T-lymphocyte activity specific for hemagglutinin (H) protein of canine distemper virus in dogs. The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science. Jan 2003;65(1):109-112.

Hoff GL, Bigler WJ, Proctor SJ, Stallings LP. Epizootic of canine distemper virus infection among urban raccoons and gray foxes. Journal of wildlife diseases. Oct 1974;10(4):423-428.

Hoffmann AS, E.; Werner, G.; Cussler, K. Pharmakovigilanzreport Tierimpfstoffe. Deutsches Tierärzteblatt. 2012(11):1554 - 1559.

Hoover JP, Castro AE, Nieves MA. Serologic evaluation of vaccinated American river otters. Journal of the American Veterinary Medical Association. Dec 1 1985;187(11):1162-1165.

- Howles S, Guimaraes-Walker A, Yang H, et al. Vaccination with a modified vaccinia virus Ankara (MVA)-vectored HIV-1 immunogen induces modest vector-specific T cell responses in human subjects. *Vaccine*. Oct 21 2010;28(45):7306-7312.
- Hu A, Cathomen T, Cattaneo R, Norrby E. Influence of N-linked oligosaccharide chains on the processing, cell surface expression and function of the measles virus fusion protein. *The Journal of general virology*. Mar 1995;76 (Pt 3):705-710.
- Hulo C, de Castro E, Masson P, et al. ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic acids research*. Jan 2011;39 (Database issue):D576-582.
- Hur K, Bae JS, Choi JH, et al. Canine distemper virus infection in binturongs (*Arctictis binturong*). *Journal of comparative pathology*. Oct 1999;121(3):295-299.
- Imhoff H, von Messling V, Herrler G, Haas L. Canine distemper virus infection requires cholesterol in the viral envelope. *Journal of virology*. Apr 2007;81(8):4158-4165.
- Itakura C, Nakamura K, Nakatsuka J, Goto M. Distemper infection in lesser pandas due to administration of a canine distemper live vaccine. *Nihon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science*. Oct 1979;41(5):561-566.
- Iwatsuki K, Miyashita N, Yoshida E, et al. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. *The Journal of general virology*. Feb 1997;78 (Pt 2):373-380.
- Jenner E. Observations on the Distemper in Dogs. *Medico-chirurgical transactions*. 1809;1:265-270.
- Jennings GT, Bachmann MF. The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biological chemistry*. May 2008;389(5):521-536.
- Jessup DA, Murray MJ, Casper DR, Brownstein D, Kreuder-Johnson C. Canine Distemper Vaccination is a Safe and Useful Preventive Procedure for Southern Sea Otters (*Enhydra lutra nereis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2009;40(4):705-710.
- Jonas S. The comparative efficacy of Green and Laidlaw-Dunkin distemper vaccination. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Jul 1947;111(844):48.
- Jones L, Tenorio E, Gorham J, Yilma T. Protective vaccination of ferrets against canine distemper with recombinant pox virus vaccines expressing the H or F genes of rinderpest virus. *American journal of veterinary research*. Jun 1997;58(6):590-593.

Jozwik A, Frymus T, Mizak B, Rzezutka A. Antibody titres against canine distemper virus in vaccinated and unvaccinated dogs. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health.* Apr 2004;51(3):99-103.

Jozwik A, Frymus T. Natural distemper in vaccinated and unvaccinated dogs in Warsaw. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health.* Nov 2002;49(9):413-414.

Kai C, Ochikubo F, Okita M, et al. Use of B95a cells for isolation of canine distemper virus from clinical cases. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science.* Dec 1993;55(6):1067-1070.

Kameo Y, Nagao Y, Nishio Y, et al. Epizootic canine distemper virus infection among wild mammals. *Veterinary microbiology.* Jan 27 2012;154(3-4):222-229.

Kapil S, Allison RW, Johnston L, 3rd, et al. Canine distemper virus strains circulating among North American dogs. *Clinical and vaccine immunology: CVI.* Apr 2008;15(4):707-712.

Karstad L, Budd J. Distemper in Raccoons Characterized by Giant-Cell Pneumonitis. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne.* Dec 1964;5(12):326-330.

Kastenmüller W, Brandes M, Wang Z, Herz J, Egen JG, Germain RN. Peripheral prepositioning and local CXCL9 chemokine-mediated guidance orchestrate rapid memory CD8⁺ T cell responses in the lymph node. *Immunity.* Mar 21 2013;38(3):502-513.

Katz M, Rorke LB, Masland WS, Brodano GB, Koprowski H. Subacute sclerosing panencephalitis: isolation of a virus encephalitogenic for ferrets. *The Journal of infectious diseases.* Feb 1970;121(2):188-195.

Kauffman CA, Bergman AG, O'Connor RP. Distemper virus infection in ferrets: an animal model of measles-induced immunosuppression. *Clinical and experimental immunology.* Mar 1982;47(3):617-625.

Kazacos KR, Thacker HL, Shivaprasad HL, Burger PP. Vaccination-induced distemper in kinkajous. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* Dec 1 1981;179(11):1166-1169.

Keller SM, Gabriel M, Terio KA, et al. Canine distemper in an isolated population of fishers (*Martes pennanti*) from California. *Journal of wildlife diseases.* Oct 2012;48(4):1035-1041.

Kennedy S, Kuiken T, Jepson PD, et al. Mass die-Off of Caspian seals caused by canine distemper virus. *Emerging infectious diseases*. Nov-Dec 2000;6(6):637-639.

Kirk H. Canine Distemper. its complications, sequelae, and treatment. London: Baillière, Tindall and Cox; 1922.

Kock R, Chalmers WS, Mwanzia J, et al. Canine distemper antibodies in lions of the Masai Mara. *The Veterinary record*. Jun 13 1998;142(24):662-665.

Kreijtz JH, Suezer Y, de Mutsert G, et al. Preclinical evaluation of a modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vaccine against influenza A/H5N1 viruses. *Vaccine*. Oct 23 2009; 27(45):6296-6299.

Kreijtz JH, Suezer Y, van Amerongen G, et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara-based vaccine induces protective immunity in mice against infection with influenza virus H5N1. *The Journal of infectious diseases*. Jun 1 2007;195(11):1598-1606.

Kremer M, Volz A, Kreijtz JH, Fux R, Lehmann MH, Sutter G. Easy and efficient protocols for working with recombinant vaccinia virus MVA. *Methods in molecular biology*. 2012;890:59-92.

Kreutzer M, Kreutzer R, Siebert U, et al. In search of virus carriers of the 1988 and 2002 phocine distemper virus outbreaks in European harbour seals. *Arch Virol*. 2008;153(1):187-192.

Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics*. Jul 2008;9(4):299-306.

Laidlaw PPD, G. W. Prevention of Canine Distemper. *British medical journal*. Dec 15 1928;2(3545):1100-1101.

Laidlaw PPD, G. W. Studies in dog distemper V: The immunization of dogs. *Journal of comparative pathology*. 1928;41:209-227.

Laidlaw PPD, G. W. Studies in dog distemper VI: Dog distemper antiserum. *Journal of comparative pathology*. 1931;44:1-25.

Lamb RAP, G. D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. Vol 1. 5. Ausgabe ed. Philadelphia, PA2007.

Lambe T. Novel viral vectored vaccines for the prevention of influenza. *Molecular medicine*. 2012;18:1153-1160.

Lan NT, Yamaguchi R, Inomata A, et al. Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Veterinary microbiology*. Jun 15 2006;115(1-3):32-42.

Langedijk JP, Daus FJ, van Oirschot JT. Sequence and structure alignment of Paramyxoviridae attachment proteins and discovery of enzymatic activity for a morbillivirus hemagglutinin. *Journal of virology*. Aug 1997;71(8):6155-6167.

Langedijk JP, Janda J, Origgi FC, et al. Canine distemper virus infects canine keratinocytes and immune cells by using overlapping and distinct regions located on one side of the attachment protein. *Journal of virology*. Nov 2011;85(21):11242-11254.

Lednicky JA, Dubach J, Kinsel MJ, et al. Genetically distant American Canine distemper virus lineages have recently caused epizootics with somewhat different characteristics in raccoons living around a large suburban zoo in the USA. *Virology journal*. 2004;1:2.

Lee MS, Tsai KJ, Chen LH, et al. The identification of frequent variations in the fusion protein of canine distemper virus. *Veterinary journal*. Feb 2010;183(2):184-190.

Lemon K, de Vries RD, Mesman AW, et al. Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates. *PLoS pathogens*. 2011;7(1):e1001263.

Li M, Schmitt PT, Li Z, McCrory TS, He B, Schmitt AP. Mumps virus matrix, fusion, and nucleocapsid proteins cooperate for efficient production of virus-like particles. *Journal of virology*. Jul 2009;83(14):7261-7272.

Lignières J. Sur la maladie des jeunes chiens et le virus filtrant de Carré. *Bull. Soc. méd. vét.* 1906(60):622-630.

Liljeroos L, Huiskonen JT, Ora A, Susi P, Butcher SJ. Electron cryotomography of measles virus reveals how matrix protein coats the ribonucleocapsid within intact virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Nov 1 2011;108(44):18085-18090.

Liu C, Coffin DL. Studies of canine distemper infection by means of fluorescein-labeled antibody. I. The pathogenesis, pathology, and diagnosis of the disease in experimentally infected ferrets. *Virology*. Feb 1957;3(1):115-131.

Loeffler IK, Howard J, Montali RJ, et al. Serosurvey of Ex Situ Giant Pandas (*Ailuropoda Melanoleuca*) and Red Pandas (*Ailurus Fulgens*) in China with Implications for Species

Conservation. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2007;38(4):559-566.

Ludlow M, Nguyen DT, Silin D, et al. Recombinant canine distemper virus strain Snyder Hill expressing green or red fluorescent proteins causes meningoencephalitis in the ferret. *Journal of virology*. Jul 2012;86(14):7508-7519.

Maia OB, Gouveia AM. Serologic response of maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) to canine and canine parvovirus vaccination distemper virus. *Journal of zoo and wildlife medicine official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*. Mar 2001;32(1):78-80.

Mamaev LV, Denikina NN, Belikov SI, et al. Characterisation of morbilliviruses isolated from Lake Baikal seals (*Phoca sibirica*). *Veterinary microbiology*. May 1995;44(2-4):251-259.

Martella V, Bianchi A, Bertoletti I, et al. Canine distemper epizootic among red foxes, Italy, 2009. *Emerging infectious diseases*. Dec 2010;16(12):2007-2009.

Martella V, Blixenkrone-Møller M, Elia G, et al. Lights and shades on an historical vaccine canine distemper virus, the Rockborn strain. *Vaccine*. Feb 1 2011;29(6):1222-1227.

Martella V, Cirone F, Elia G, et al. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Veterinary microbiology*. Sep 10 2006;116(4):301-309.

Masse N, Ainouze M, Neel B, Wild TF, Buckland R, Langedijk JP. Measles virus (MV) hemagglutinin: evidence that attachment sites for MV receptors SLAM and CD46 overlap on the globular head. *Journal of virology*. Sep 2004;78(17):9051-9063.

Masson P, Hulo C, De Castro E, et al. ViralZone: recent updates to the virus knowledge resource. *Nucleic acids research*. Jan 2013;41 (Database issue):D579-583.

Mateo M, Navaratnarajah CK, Syed S, Cattaneo R. The Measles Virus Hemagglutinin beta-Propeller Head beta4-beta5 Hydrophobic Groove Governs Functional Interactions with Nectin-4 and CD46 but Not Those with the Signaling Lymphocytic Activation Molecule. *Journal of virology*. Aug 2013;87(16):9208-9216.

Mayr A, Munz E. [Changes in the vaccinia virus through continuing passages in chick embryo fibroblast cultures]. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*. 1. Abt. Medizinisch-hygienische Bakteriologie, Virusforschung und Parasitologie. Originale. Dec 1964;195(1):24-35.

- Mayr A. Taking advantage of the positive side-effects of smallpox vaccination. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*. Jun 2004;51(5):199-201.
- Mayr AH-M, V.; Stickl, H. Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. *Infection*. 1975(3):6-14.
- McCarthy AJ, Shaw MA, Goodman SJ. Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*. Dec 22 2007; 274(1629):3165-3174.
- McClelland R, Gillespie JH. Canine immunization. *The Cornell veterinarian*. Apr 1966; 56(2):300-305.
- McCullough B, Krakowka S, Koestner A. Experimental canine distemper virus-induced lymphoid depletion. *The American journal of pathology*. Jan 1974;74(1):155-170.
- McInnes EF, Burroughs RE, Duncan NM. Possible vaccine-induced canine distemper in a South American bush dog (*Speothos venaticus*). *Journal of wildlife diseases*. Oct 1992; 28(4):614-617.
- McLaughlin BG, Adams PS, Cornell WD, Elkins AD. Canine distemper viral inclusions in blood cells of four vaccinated dogs. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne*. Dec 1985;26(12):368-372.
- Meertens N, Stoffel MH, Cherpillod P, Wittek R, Vandeveld M, Zurbriggen A. Mechanism of reduction of virus release and cell-cell fusion in persistent canine distemper virus infection. *Acta neuropathologica*. Oct 2003;106(4):303-310.
- Meeusen EN. Exploiting mucosal surfaces for the development of mucosal vaccines. *Vaccine*. Nov 3 2011;29(47):8506-8511.
- Megid J, de Souza VA, Teixeira CR, et al. Canine distemper virus in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in Brazil: case report and phylogenetic analyses. *Journal of wildlife diseases*. Apr 2009;45(2):527-530.
- Megid J, Teixeira CR, Amorin RL, et al. First identification of canine distemper virus in hoary fox (*Lycalopex vetulus*): pathologic aspects and virus phylogeny. *Journal of wildlife diseases*. Jan 2010;46(1):303-305.

- Meisinger-Henschel C, Schmidt M, Lukassen S, et al. Genomic sequence of chorioallantois vaccinia virus Ankara, the ancestor of modified vaccinia virus Ankara. *The Journal of general virology*. Dec 2007;88(Pt 12):3249-3259.
- Meli ML, Simmler P, Cattori V, et al. Importance of canine distemper virus (CDV) infection in free-ranging Iberian lynxes (*Lynx pardinus*). *Veterinary microbiology*. Nov 20 2010;146(1-2):132-137.
- Metzler AE, Higgins RJ, Krakowka S, Koestner A. Virulence of tissue culture-propagated canine distemper virus. *Infection and immunity*. Sep 1980;29(3):940-944.
- Meyer H, Sutter G, Mayr A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *The Journal of general virology*. May 1991;72 (Pt 5):1031-1038.
- M'Gowan JP. Some observations on a laboratory epidemic, principally among dogs and cats, in which the animals affected presented the symptoms of the disease called "distemper". *J. Path. Bact.* . 1911;15:372-426.
- Millian S, Maisel J, Kempe CH, Plotkin S, Pagano J, Warren J. Antibody response of man to canine distemper virus. *Journal of bacteriology*. Apr 1960;79:616-618.
- Miller RL, Ramsey GA, Krenitsky TA, Elion GB. Guanine phosphoribosyltransferase from *Escherichia coli*, specificity and properties. *Biochemistry*. Dec 5 1972;11(25):4723-4731.
- Mochizuki M, Hashimoto M, Hagiwara S, Yoshida Y, Ishiguro S. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *Journal of clinical microbiology*. Sep 1999;37(9):2936-2942.
- Monne I, Fusaro A, Valastro V, et al. A distinct CDV genotype causing a major epidemic in Alpine wildlife. *Veterinary microbiology*. May 12 2011;150(1-2):63-69.
- Montali RJ, Bartz CR, Teare JA, Allen JT, Appel MJ, Bush M. Clinical trials with canine distemper vaccines in exotic carnivores. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Dec 1 1983;183(11):1163-1167.
- Morell V. Canine distemper virus. Serengeti's big cats going to the dogs. *Science*. Jun 17 1994; 264(5166):1664.
- Mos L, Ross PS, McIntosh D, Raverty S. Canine distemper virus in river otters in British Columbia as an emergent risk for coastal pinnipeds. *The Veterinary record*. Feb 22 2003;

152(8):237-239.

Moss B, Earl PL. Overview of the vaccinia virus expression system. Current protocols in molecular biology/edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]. Nov 2002; Chapter 16:Unit16 15.

Moss B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Oct 15 1996;93(21):11341-11348.

Moura RA, Warren J. Subclinical infection of dogs by canine-adapted measles virus evidenced by their subsequent immunity to canine distemper virus. Journal of bacteriology. Nov 1961;82:702-705.

Mühlebach MD, Mateo M, Sinn PL, et al. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. Nature. Dec 22 2011;480(7378):530-533.

Müller A, Silva E, Santos N, Thompson G. Domestic dog origin of canine distemper virus in free-ranging wolves in Portugal as revealed by hemagglutinin gene characterization. Journal of wildlife diseases. Jul 2011;47(3):725-729.

Müller, MV; Sutter, G.; Fux, R. Poster: Staupe-Impfung von Zootieren im deutschsprachigen Raum. 11. Jahrestagung der DVG-ZWE in Görlitz.2012.

Munson L, Terio KA, Kock R, et al. Climate extremes promote fatal co-infections during canine distemper epidemics in African lions. PloS one. 2008;3(6):e2545.

Myers DL, Zurbriggen A, Lutz H, Pospischil A. Distemper: not a new disease in lions and tigers. Clinical and diagnostic laboratory immunology. Mar 1997;4(2):180-184.

Nagao Y, Nishio Y, Shiomoda H, et al. An Outbreak of Canine Distemper Virus in Tigers (*Panthera tigris*): Possible Transmission from Wild Animals to Zoo Animals. Journal of Veterinary Medical Science. 2012;74(6):699-705.

Naim HY, Ehler E, Billeter MA. Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells. The EMBO journal. Jul 17 2000;19(14):3576-3585.

Negrao FJ, Gardinali NR, Headley SA, Alfieri AA, Fernandez MA, Alfieri AF. Phylogenetic analyses of the hemagglutinin gene of wild-type strains of canine distemper virus in southern Brazil. Genetics and molecular research : GMR. Mar 11 2013;12(AOP).

Nicolle MC. La maladie du jeune age des chiens est transmissible expérimentalement à l'homme sous forme inapparente. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. 1931;1069-1071.

Nielsen O, Smith G, Weingartl H, Lair S, Measures L. Use of a SLAM transfected Vero cell line to isolate and characterize marine mammal morbilliviruses using an experimental ferret model. Journal of wildlife diseases. Jul 2008;44(3):600-611.

Nikolin VM, Osterrieder K, von Messling V, et al. Antagonistic pleiotropy and fitness trade-offs reveal specialist and generalist traits in strains of canine distemper virus. PloS one. 2012; 7(12):e50955.

Nikolin VM, Wibbelt G, Michler FU, Wolf P, East ML. Susceptibility of carnivore hosts to strains of canine distemper virus from distinct genetic lineages. Veterinary microbiology. Apr 23 2012;156(1-2):45-53.

Norder M, Becker PD, Drexler I, Link C, Erfle V, Guzman CA. Modified vaccinia virus Ankara exerts potent immune modulatory activities in a murine model. PloS one. 2010;5(6):e11400.

Norrby E, Utter G, Örvell C, Appel MJ. Protection against canine distemper virus in dogs after immunization with isolated fusion protein. Journal of virology. May 1986;58(2):536-541.

Norrby E, Sheshberadaran H, McCullough KC, Carpenter WC, Örvell C. Is rinderpest virus the archevirus of the Morbillivirus genus? Intervirology. 1985;23(4):228-232.

Norris JM, Krockenberger MB, Baird AA, Knudsen G. Canine distemper: re-emergence of an old enemy. Australian veterinary journal. Oct 2006;84(10):362-363.

Nouvellet P, Donnelly CA, De Nardi M, et al. Rabies and canine distemper virus epidemics in the red fox population of northern Italy (2006-2010). PloS one. 2013;8(4):e61588.

Noyce RS, Bondre DG, Ha MN, et al. Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. PLoS pathogens. Aug 2011;7(8):e1002240.

Obeid OE, Partidos CD, Howard CR, Steward MW. Protection against morbillivirus-induced encephalitis by immunization with a rationally designed synthetic peptide vaccine containing B- and T-cell epitopes from the fusion protein of measles virus. Journal of virology. Mar 1995;69(3):1420-1428.

Ohashi K, Iwatsuki K, Murata K, et al. Properties of a new CDV isolate from a raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*) in Japan. *The Veterinary record*. Feb 3 2001; 148(5):148-150.

Okada H, Kobune F, Sato TA, et al. Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch Virol*. 2000;145(5):905-920.

Origgi FC, Plattet P, Sattler U, et al. Emergence of canine distemper virus strains with modified molecular signature and enhanced neuronal tropism leading to high mortality in wild carnivores. *Vet Pathol*. Nov 2012;49(6):913-929.

Origgi FC, Sattler U, Pilo P, Waldvogel AS. Fatal Combined Infection With Canine Distemper Virus and Orthopoxvirus in a Group of Asian Marmots (*Marmota caudata*). *Vet Pathol*. Feb 4 2013.

Örvell C, Blixenkrone-Møller M, Svansson V, Have P. Immunological relationships between phocid and canine distemper virus studied with monoclonal antibodies. *The Journal of general virology*. Sep 1990;71 (Pt 9):2085-2092.

Örvell C, Sheshberadaran H, Norrby E. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against four structural components of canine distemper virus. *The Journal of general virology*. Mar 1985;66 (Pt 3):443-456.

Pantua HD, McGinnes LW, Peeples ME, Morrison TG. Requirements for the assembly and release of Newcastle disease virus-like particles. *Journal of virology*. Nov 2006;80(22):11062-11073.

Panzer Y, Calderon MG, Sarute N, et al. Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. *Virus research*. Jan 2012;163(1):401-404.

Paran N, Sutter G. Smallpox vaccines: New formulations and revised strategies for vaccination. *Human vaccines*. Dec 2009;5(12):824-831.

Pardo ID, Johnson GC, Kleiboeker SB. Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. *Journal of clinical microbiology*. Oct 2005;43(10):5009-5017.

Pardo MC, Bauman JE, Mackowiak M. Protection of dogs against canine distemper by vaccination with a canarypox virus recombinant expressing canine distemper virus fusion and hemagglutinin glycoproteins. *American journal of veterinary research*. Aug 1997;58(8):833-836.

Pare JA, Barker IK, Crawshaw GJ, McEwen SA, Carman PS, Johnson RP. Humoral response and protection from experimental challenge following vaccination of raccoon pups with a modified-live canine distemper virus vaccine. *Journal of wildlife diseases*. Jul 1999;35(3):430-439.

Pastoret PP, Brochier B. The development and use of a vaccinia-rabies recombinant oral vaccine for the control of wildlife rabies; a link between Jenner and Pasteur. *Epidemiology and infection*. Jun 1996;116(3):235-240.

Patch JR, Han Z, McCarthy SE, et al. The YPLGVG sequence of the Nipah virus matrix protein is required for budding. *Virology journal*. 2008;5:137.

Patel JR, Heldens JG, Bakonyi T, Rusvai M. Important mammalian veterinary viral immunodiseases and their control. *Vaccine*. Feb 27 2012;30(10):1767-1781.

Pavlova NN, Pallasch C, Elia AE, et al. A role for PVRL4-driven cell-cell interactions in tumorigenesis. *eLife*. 2013;2:e00358.

Pearson GL. Vaccine-induced canine distemper virus in black-footed ferrets. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Jan 15 1977;170(2):103, 106, 109.

Perez de Val B, Vidal E, Villarreal-Ramos B, et al. A multi-antigenic adenoviral-vectored vaccine improves BCG-induced protection of goats against pulmonary tuberculosis infection and prevents disease progression. *PloS one*. 2013;8(11):e81317.

Phelps AL, Gates AJ, Hillier M, Eastaugh L, Ulaeto DO. Comparative efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA) as a potential replacement smallpox vaccine. *Vaccine*. Jan 2 2007;25(1):34-42.

Pinder GD. Canine Distemper. *Canadian journal of comparative medicine*. Jan 1938;2(1):13-17.

Plattet P, Langedijk JP, Zipperle L, Vandeveld M, Örvell C, Zurbriggen A. Conserved leucine residue in the head region of morbillivirus fusion protein regulates the large conformational change during fusion activity. *Biochemistry*. Sep 29 2009;48(38):9112-9121.

Plattet P, Cherpillod P, Wiener D, et al. Signal peptide and helical bundle domains of virulent canine distemper virus fusion protein restrict fusogenicity. *Journal of virology*. Oct 2007;81(20):11413-11425.

Plattet P, Rivals JP, Zuber B, Brunner JM, Zurbriggen A, Wittek R. The fusion protein of wild-type canine distemper virus is a major determinant of persistent infection. *Virology*. Jul 5 2005;

337(2):312-326.

Plempner RK, Brindley MA, Iorio RM. Structural and mechanistic studies of measles virus illuminate paramyxovirus entry. *PLoS pathogens*. Jun 2011;7(6):e1002058.

Plempner RK, Hammond AL, Gerlier D, Fielding AK, Cattaneo R. Strength of Envelope Protein Interaction Modulates Cytopathicity of Measles Virus. *Journal of virology*. 2002;76(10):5051-5061.

Pohl C, Duprex WP, Krohne G, Rima BK, Schneider-Schaulies S. Measles virus M and F proteins associate with detergent-resistant membrane fractions and promote formation of virus-like particles. *The Journal of general virology*. Apr 2007;88(Pt 4):1243-1250.

Povey RC. Distemper vaccination of dogs: factors which could cause vaccine failure. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne*. Sep 1986;27(9):321-323.

Pratakpiriya W, Seki F, Otsuki N, et al. Nectin4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus and involved in neurovirulence. *Journal of virology*. Sep 2012;86(18):10207-10210.

Price PJ, Torres-Dominguez LE, Brandmuller C, Sutter G, Lehmann MH. Modified vaccinia virus Ankara: Innate immune activation and induction of cellular signalling. *Vaccine*. Mar 21 2013.

Puntoni V. Saggio di vaccinazione anticimurrosa preventiva eseguita per mezzo del virus specifico. *Annali di Igene*. 1923;33:553.

Qiu W, Zheng Y, Zhang S, et al. Canine distemper outbreak in rhesus monkeys, China. *Emerging infectious diseases*. Aug 2011;17(8):1541-1543.

Quigley KS, Evermann JF, Leathers CW, et al. Morbillivirus infection in a wild siberian tiger in the Russian Far East. *Journal of wildlife diseases*. Oct 2010;46(4):1252-1256.

Ramirez JC, Gherardi MM, Rodriguez D, Esteban M. Attenuated modified vaccinia virus Ankara can be used as an immunizing agent under conditions of preexisting immunity to the vector. *Journal of virology*. Aug 2000;74(16):7651-7655.

Rikula U, Nuotio L, Sihvonen L. Canine distemper virus neutralising antibodies in vaccinated dogs. *The Veterinary record*. Nov 18 2000;147(21):598-603.

Rikula U, Nuotio L, Sihvonen L. Vaccine coverage, herd immunity and occurrence of canine distemper from 1990-1996 in Finland. *Vaccine*. Nov 19 2007;25(47):7994-7998.

Rima BK, Baczko K, Imagawa DT, ter Meulen V. Humoral immune response in dogs with old dog encephalitis and chronic distemper meningo-encephalitis. *The Journal of general virology*. Jun 1987;68 (Pt 6):1723-1735.

Rivals JP, Plattet P, Currat-Zweifel C, Zurbriggen A, Wittek R. Adaptation of canine distemper virus to canine footpad keratinocytes modifies polymerase activity and fusogenicity through amino acid substitutions in the P/V/C and H proteins. *Virology*. Mar 1 2007;359(1):6-18.

Rockborn G, Norrby E, Lannek N. Comparison between the immunizing effect in dogs and ferrets of living distemper vaccines, attenuated in dog tissue cultures and embryonated eggs. *Research in veterinary science*. Oct 1965;6(4):423-427.

Rockborn G. An attenuated strain of canine distemper virus in tissue culture. *Nature*. Sep 12 1959;184(Suppl 11):822.

Rodeheffer C, von Messling V, Milot S, Lepine F, Manges AR, Ward BJ. Disease manifestations of canine distemper virus infection in ferrets are modulated by vitamin A status. *The Journal of nutrition*. Aug 2007;137(8):1916-1922.

Roelke-Parker ME, Munson L, Packer C, et al. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature*. Feb 1 1996;379(6564):441-445.

Roscoe DE. Epizootiology of canine distemper in New Jersey raccoons. *Journal of wildlife diseases*. Jul 1993;29(3):390-395.

Rudd PA, Cattaneo R, von Messling V. Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *Journal of virology*. Oct 2006;80(19):9361-9370.

Runkler N, Pohl C, Schneider-Schaulies S, Klenk HD, Maisner A. Measles virus nucleocapsid transport to the plasma membrane requires stable expression and surface accumulation of the viral matrix protein. *Cellular microbiology*. May 2007;9(5):1203-1214.

Said R, Amato RJ. Identification of Pre- and Post-Treatment Markers, Clinical, and Laboratory Parameters Associated with Outcome in Renal Cancer Patients Treated with MVA-5T4. *Frontiers in oncology*. 2013;3:185.

Sakai K, Nagata N, Ami Y, et al. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. *Journal of virology*. Jan 2013;87(2):1105-1114.

- Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, et al. Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors. *Journal of virology*. Jun 2013; 87(12):7170-7175.
- Sancho MC, Schleich S, Griffiths G, Krijnse-Locker J. The block in assembly of modified vaccinia virus Ankara in HeLa cells reveals new insights into vaccinia virus morphogenesis. *Journal of virology*. Aug 2002;76(16):8318-8334.
- Santos N, Almendra C, Tavares L. Serologic survey for canine distemper virus and canine parvovirus in free-ranging wild carnivores from Portugal. *Journal of wildlife diseases*. Jan 2009;45(1):221-226.
- Sarkar J, Balamurugan V, Sen A, et al. Sequence analysis of morbillivirus CD150 receptor-Signaling Lymphocyte Activation Molecule (SLAM) of different animal species. *Virus genes*. Dec 2009;39(3):335-341.
- Sato H, Yoneda M, Honda T, Kai C. Morbillivirus receptors and tropism: multiple pathways for infection. *Frontiers in microbiology*. 2012;3:75.
- Sato TA, Kohama T, Sugiura A. Intracellular processing of measles virus fusion protein. *Arch Virol*. 1988;98(1-2):39-50.
- Sawatsky B, von Messling V. Canine distemper viruses expressing a hemagglutinin without N-glycans lose virulence but retain immunosuppression. *Journal of virology*. Mar 2010; 84(6):2753-2761.
- Schmitt AP, Leser GP, Waning DL, Lamb RA. Requirements for Budding of Paramyxovirus Simian Virus 5 Virus-Like Particles. *Journal of virology*. 2002;76(8):3952-3964.
- Schobesberger M, Summerfield A, Doherr MG, Zurbriggen A, Griot C. Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. *Vet Immunol Immunopathol*. Mar 10 2005;104(1-2):33-44.
- Schönbauer M KS, Schönbauer-Längle A. Perinatale Staupeinfektion bei drei Eisbären (*Ursus maritimus*) und bei einem Brillenbären (*Tremarctos ornatus*). *Verh Int Symp Erkrank Zoot*. 1984(26):131-136.
- Schultz RD, Thiel B, Mukhtar E, Sharp P, Larson LJ. Age and long-term protective immunity in dogs and cats. *Journal of comparative pathology*. Jan 2010;142 Suppl 1:S102-108.

Schultz RD. Duration of immunity for canine and feline vaccines: a review. *Veterinary microbiology*. Oct 5 2006;117(1):75-79.

Seimon TA, Miquelle DG, Chang TY, et al. Canine Distemper Virus: an Emerging Disease in Wild Endangered Amur Tigers (*Panthera tigris altaica*). *mBio*. 2013;4(4).

Seki F, Ono N, Yamaguchi R, Yanagi Y. Efficient Isolation of Wild Strains of Canine Distemper Virus in Vero Cells Expressing Canine SLAM (CD150) and Their Adaptability to Marmoset B95a Cells. *Journal of virology*. 2003;77(18):9943-9950.

Sekulin K, Hafner-Marx A, Kolodziejek J, Janik D, Schmidt P, Nowotny N. Emergence of canine distemper in Bavarian wildlife associated with a specific amino acid exchange in the haemagglutinin protein. *Veterinary journal*. Mar 2011;187(3):399-401.

Sheshberadaran H, Norrby E, McCullough KC, Carpenter WC, Örvell C. The antigenic relationship between measles, canine distemper and rinderpest viruses studied with monoclonal antibodies. *The Journal of general virology*. Jul 1986;67 (Pt 7):1381-1392.

Sheshberadaran H, Norrby E. Characterization of epitopes on the measles virus hemagglutinin. *Virology*. Jul 15 1986;152(1):58-65.

Simon-Martinez J, Ulloa-Arvizu R, Soriano VE, Fajardo R. Identification of a genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in Mexico. *Veterinary journal*. Mar 2008;175(3):423-426.

Sobrino R, Arnal MC, Luco DF, Gortazar C. Prevalence of antibodies against canine distemper virus and canine parvovirus among foxes and wolves from Spain. *Veterinary microbiology*. Jan 1 2008;126(1-3):251-256.

Song F, Fux R, Provacia LB, et al. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) spike protein delivered by Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) efficiently induces virus-neutralizing antibodies. *Journal of virology*. Aug 28 2013.

Staib C, Drexler I, Sutter G. Construction and isolation of recombinant MVA. *Methods in molecular biology*. 2004;269:77-100.

Stephensen CB, Welter J, Thaker SR, Taylor J, Tartaglia J, Paoletti E. Canine distemper virus (CDV) infection of ferrets as a model for testing Morbillivirus vaccine strategies: NYVAC- and ALVAC-based CDV recombinants protect against symptomatic infection. *Journal of virology*. Feb 1997;71(2):1506-1513.

Stern LB, Greenberg M, Gershoni JM, Rozenblatt S. The hemagglutinin envelope protein of canine distemper virus (CDV) confers cell tropism as illustrated by CDV and measles virus complementation analysis. *Journal of virology*. Mar 1995;69(3):1661-1668.

Stettler M, Beck K, Wagner A, Vandeveld M, Zurbriggen A. Determinants of persistence in canine distemper viruses. *Veterinary microbiology*. Jun 30 1997;57(1):83-93.

Stickl H, Hochstein-Mintzel V, Mayr A, Huber HC, Schafer H, Holzner A. [MVA vaccination against smallpox: clinical tests with an attenuated live vaccinia virus strain (MVA) (author's transl)]. *Deutsche medizinische Wochenschrift*. Nov 22 1974;99(47):2386-2392.

Stittelaar KJ, Osterhaus AD. MVA: a cuckoo in the vaccine nest? *Vaccine*. Jun 14 2001;19(27):V-VI.

Stittelaar KJ, Kuiken T, de Swart RL, et al. Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques. *Vaccine*. Jun 14 2001;19(27):3700-3709.

Stittelaar KJ, Lacombe V, van Lavieren R, et al. Cross-clade immunity in cats vaccinated with a canarypox-vectored avian influenza vaccine. *Vaccine*. Jul 12 2010;28(31):4970-4976.

Sugahara F, Uchiyama T, Watanabe H, et al. Paramyxovirus Sendai virus-like particle formation by expression of multiple viral proteins and acceleration of its release by C protein. *Virology*. Jul 20 2004;325(1):1-10.

Sun Z, Li A, Ye H, Shi Y, Hu Z, Zeng L. Natural infection with canine distemper virus in hand-feeding Rhesus monkeys in China. *Veterinary microbiology*. Mar 24 2010;141(3-4):374-378.

Suter SE, Chein MB, von Messling V, et al. In vitro canine distemper virus infection of canine lymphoid cells: a prelude to oncolytic therapy for lymphoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. Feb 15 2005;11(4):1579-1587.

Sutherland-Smith MR, Rideout BA, Mikolon AB, et al. Vaccine-induced canine distemper in European mink, *Mustela lutreola*. *Journal of zoo and wildlife medicine: official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*. Sep 1997;28(3):312-318.

Sutter G, Moss B. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Nov 15 1992;89(22):10847-10851.

Sutter G, Wyatt LS, Foley PL, Bennink JR, Moss B. A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine*. Aug 1994;12(11):1032-1040.

Svansson V, Blixenkrone-Møller M, Skirnisson K, et al. Infection studies with canine distemper virus in harbour seals. *Arch Virol*. 1993;131(3-4):349-359.

Tahara M, Ohno S, Sakai K, et al. The receptor-binding site of the measles virus hemagglutinin protein itself constitutes a conserved neutralizing epitope. *Journal of virology*. Mar 2013; 87(6):3583-3586.

Tahara M, Takeda M, Yanagi Y. Altered interaction of the matrix protein with the cytoplasmic tail of hemagglutinin modulates measles virus growth by affecting virus assembly and cell-cell fusion. *Journal of virology*. Jul 2007;81(13):6827-6836.

Takayama I, Kubo M, Takenaka A, et al. Pathological and phylogenetic features of prevalent canine distemper viruses in wild masked palm civets in Japan. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. Nov 2009;32(6):539-549.

Takeda M, Tahara M, Nagata N, Seki F. Wild-Type Measles Virus is Intrinsically Dual-Tropic. *Frontiers in microbiology*. 2011;2:279.

Takeuchi K, Miyajima N, Nagata N, Takeda M, Tashiro M. Wild-type measles virus induces large syncytium formation in primary human small airway epithelial cells by a SLAM(CD150)-independent mechanism. *Virus research*. Jul 2003;94(1):11-16.

Takimoto T, Murti KG, Bousse T, Scroggs RA, Portner A. Role of matrix and fusion proteins in budding of Sendai virus. *Journal of virology*. Dec 2001;75(23):11384-11391.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*. Aug 2007;24(8):1596-1599.

Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y. Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *Journal of virology*. Jul 2001;75(13):5842-5850.

Taylor J, Pincus S, Tartaglia J, et al. Vaccinia virus recombinants expressing either the measles virus fusion or hemagglutinin glycoprotein protect dogs against canine distemper virus challenge. *Journal of virology*. Aug 1991;65(8):4263-4274.

Taylor J, Weinberg R, Tartaglia J, et al. Nonreplicating viral vectors as potential vaccines: recombinant canarypox virus expressing measles virus fusion (F) and hemagglutinin (HA)

glycoproteins. *Virology*. Mar 1992;187(1):321-328.

Techangamsuwan S, Haas L, Rohn K, Baumgartner W, Wewetzer K. Distinct cell tropism of canine distemper virus strains to adult olfactory ensheathing cells and Schwann cells in vitro. *Virus research*. Sep 2009;144(1-2):195-201.

Timm SF, Munson L, Summers BA, et al. A suspected canine distemper epidemic as the cause of a catastrophic decline in Santa Catalina Island foxes (*Urocyon littoralis catalinae*). *Journal of wildlife diseases*. Apr 2009;45(2):333-343.

Tipold A, Vandeveld M, Wittek R, Moore P, Summerfield A, Zurbriggen A. Partial protection and intrathecal invasion of CD8(+) T cells in acute canine distemper virus infection. *Veterinary microbiology*. Nov 26 2001;83(3):189-203.

Tipold A, Moore P, Zurbriggen A, Burgener I, Barben G, Vandeveld M. Early T cell response in the central nervous system in canine distemper virus infection. *Acta neuropathologica*. Jan 1999;97(1):45-56.

Torrey JC, Rahe AH. Studies in Canine Distemper. *The Journal of medical research*. Jan 1913;27(3):291-364 297.

Trebbien R, Chriel M, Struve T, Hjulsager CK, Larsen G, Larsen LE. Wildlife Reservoirs of Canine Distemper Virus Resulted in a Major Outbreak in Danish Farmed Mink (*Neovison vison*). *PloS one*. Jan 13 2014;9(1):e85598.

Tryland M, Neuvonen E, Huovilainen A, et al. Serologic survey for selected virus infections in polar bears at Svalbard. *Journal of wildlife diseases*. Apr 2005;41(2):310-316.

Uema M, Ohashi K, Wakasa C, Kai C. Phylogenetic and restriction fragment length polymorphism analyses of hemagglutinin (H) protein of canine distemper virus isolates from domestic dogs in Japan. *Virus research*. Apr 2005;109(1):59-63.

van de Bildt MW, Kuiken T, Visee AM, Lema S, Fitzjohn TR, Osterhaus AD. Distemper outbreak and its effect on African wild dog conservation. *Emerging infectious diseases*. Feb 2002;8(2):211-213.

Van Heerden J, Bainbridge N, Burroughs RE, Kriek NP. Distemper-like disease and encephalitozoonosis in wild dogs (*Lycaon pictus*). *Journal of wildlife diseases*. Jan 1989;25(1):70-75.

van Moll P, Alldinger S, Baumgartner W, Adami M. Distemper in wild carnivores: an epidemiological, histological and immunocytochemical study. *Veterinary microbiology*. May 1995;44(2-4):193-199.

van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. *Vaccine*. Aug 31 2012;30(40):5893-5900.

Verardi PH, Aziz FH, Ahmad S, et al. Long-Term Sterilizing Immunity to Rinderpest in Cattle Vaccinated with a Recombinant Vaccinia Virus Expressing High Levels of the Fusion and Hemagglutinin Glycoproteins. *Journal of virology*. 2002;76(2):484-491.

Verardi PH, Titong A, Hagen CJ. A vaccinia virus renaissance: new vaccine and immunotherapeutic uses after smallpox eradication. *Human vaccines & immunotherapeutics*. Jul 2012;8(7):961-970.

Verheust C, Goossens M, Pauwels K, Breyer D. Biosafety aspects of modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vectors used for gene therapy or vaccination. *Vaccine*. Mar 30 2012;30(16):2623-2632.

Vetidata. Emmerich, I.; Otilie, H.; Hertzsch, R. www.vetidata.de. 2013.

Visser IK, Vedder EJ, van de Bildt MW, Örvell C, Barrett T, Osterhaus AD. Canine distemper virus ISCOMs induce protection in harbour seals (*Phoca vitulina*) against phocid distemper but still allow subsequent infection with phocid distemper virus-1. *Vaccine*. 1992;10(7):435-438.

von Messling V, Milosevic D, Cattaneo R. Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Sep 28 2004;101(39):14216-14221.

von Messling V, Milosevic D, Devaux P, Cattaneo R. Canine distemper virus and measles virus fusion glycoprotein trimers: partial membrane-proximal ectodomain cleavage enhances function. *Journal of virology*. Aug 2004;78(15):7894-7903.

von Messling V, Oezguen N, Zheng Q, Vongpunsawad S, Braun W, Cattaneo R. Nearby clusters of hemagglutinin residues sustain SLAM-dependent canine distemper virus entry in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of virology*. May 2005;79(9):5857-5862.

von Messling V, Springfield C, Devaux P, Cattaneo R. A Ferret Model of Canine Distemper Virus Virulence and Immunosuppression. *Journal of virology*. 2003;77(23):12579-12591.

von Messling V, Zimmer G, Herrler G, Haas L, Cattaneo R. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *Journal of virology*. Jul 2001; 75(14):6418-6427.

Wang Z, Martinez J, Zhou W, et al. Modified H5 promoter improves stability of insert genes while maintaining immunogenicity during extended passage of genetically engineered MVA vaccines. *Vaccine*. Feb 10 2010;28(6):1547-1557.

Wang Z, La Rosa C, Maas R, et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing a soluble form of glycoprotein B causes durable immunity and neutralizing antibodies against multiple strains of human cytomegalovirus. *Journal of virology*. Apr 2004;78(8):3965-3976.

Watanabe M, Wang A, Sheng J, et al. Delayed activation of altered fusion glycoprotein in a chronic measles virus variant that causes subacute sclerosing panencephalitis. *Journal of neurovirology*. Dec 1995;1(5-6):412-423.

Weidinger G, Ohlmann M, Schlereth B, Sutter G, Niewiesk S. Vaccination with recombinant modified vaccinia virus Ankara protects against measles virus infection in the mouse and cotton rat model. *Vaccine*. Apr 6 2001;19(20-22):2764-2768.

Welter J, Taylor J, Tartaglia J, Paoletti E, Stephensen CB. Vaccination against canine distemper virus infection in infant ferrets with and without maternal antibody protection, using recombinant attenuated poxvirus vaccines. *Journal of virology*. Jul 2000;74(14):6358-6367.

Wenzlow N, Plattet P, Wittek R, Zurbriggen A, Grone A. Immunohistochemical demonstration of the putative canine distemper virus receptor CD150 in dogs with and without distemper. *Vet Pathol*. Nov 2007;44(6):943-948.

Weyer J, Rupprecht CE, Mans J, Viljoen GJ, Nel LH. Generation and evaluation of a recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine for rabies. *Vaccine*. May 22 2007;25(21):4213-4222.

Wiener DJ, Welle MM, Origgi FC. Cutaneous lesions associated with dual infection caused by canine distemper virus and orthopoxvirus in a domestic cat. *Veterinary dermatology*. Jul 19 2013.

Wild TF, Bernard A, Spehner D, Drillien R. Construction of vaccinia virus recombinants expressing several measles virus proteins and analysis of their efficacy in vaccination of mice. *The Journal of general virology*. Feb 1992;73 (Pt 2):359-367.

Wild TF, Bernard A, Spehner D, Villeval D, Drillien R. Vaccination of mice against canine distemper virus-induced encephalitis with vaccinia virus recombinants encoding measles or canine distemper virus antigens. *Vaccine*. 1993;11(4):438-444.

Williams ES, Anderson SL, Cavender J, et al. Vaccination of black-footed ferret (*Mustela nigripes*) x Siberian polecat (*M. eversmanni*) hybrids and domestic ferrets (*M. putorius furo*) against canine distemper. *Journal of wildlife diseases*. Jul 1996;32(3):417-423.

Williams ES, Thorne ET, Appel MJ, Belitsky DW. Canine distemper in black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) from Wyoming. *Journal of wildlife diseases*. Jul 1988;24(3):385-398.

Wimsatt J, Biggins D, Innes K, Taylor B, Garell D. Evaluation of oral and subcutaneous delivery of an experimental canarypox recombinant canine distemper vaccine in the Siberian polecat (*Mustela eversmanni*). *Journal of zoo and wildlife medicine: official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*. Mar 2003;34(1):25-35.

Woma TY, van Vuuren M, Bosman AM, Quan M, Oosthuizen M. Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: lineage Africa. *Veterinary microbiology*. Jul 14 2010;143(2-4):126-132.

Woo GH, Jho YS, Bak EJ. Canine distemper virus infection in fennec fox (*Vulpes zerda*). *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. Aug 2010; 72(8):1075-1079.

Wood SL, Thomson GW, Haines DM. Canine distemper virus-like infection in a captive African lioness. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne*. Jan 1995; 36(1):34-35.

Wyatt LS, Earl PL, Vogt J, et al. Correlation of immunogenicities and in vitro expression levels of recombinant modified vaccinia virus Ankara HIV vaccines. *Vaccine*. Jan 24 2008; 26(4):486-493.

Wyatt LS, Shors ST, Murphy BR, Moss B. Development of a replication-deficient recombinant vaccinia virus vaccine effective against parainfluenza virus 3 infection in an animal model. *Vaccine*. Oct 1996;14(15):1451-1458.

Wyatt LS, Moss B, Rozenblatt S. Replication-deficient vaccinia virus encoding bacteriophage T7 RNA polymerase for transient gene expression in mammalian cells. *Virology*. Jun 20 1995; 210(1):202-205.

- Wyss-Fluehmann G, Zurbriggen A, Vandewelde M, Plattet P. Canine distemper virus persistence in demyelinating encephalitis by swift intracellular cell-to-cell spread in astrocytes is controlled by the viral attachment protein. *Acta neuropathologica*. May 2010; 119(5):617-630.
- Yamanouchi K, Sato TA, Kobune F, Shishido A. Antibody responses in the cerebrospinal fluid of cynomolgus monkeys after intracerebral inoculation with paramyxoviruses. *Infection and immunity*. Feb 1979;23(2):185-191.
- Yanagi Y, Takeda M, Ohno S. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *The Journal of general virology*. Oct 2006;87(Pt 10):2767-2779.
- Yoshikawa Y, Ochikubo F, Matsubara Y, et al. Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Veterinary microbiology*. Jul 1989;20(3):193-205.
- Zhou D, Zhang Y, Li Q, et al. Matrix protein-specific IgA antibody inhibits measles virus replication by intracellular neutralization. *Journal of virology*. Nov 2011;85(21):11090-11097.
- Zipperle L, Langedijk JP, Örvell C, Vandewelde M, Zurbriggen A, Plattet P. Identification of key residues in virulent canine distemper virus hemagglutinin that control CD150/SLAM-binding activity. *Journal of virology*. Sep 2010;84(18):9618-9624.

IX. ANHANG TABELLEN UND SEQUENZEN

Tabelle 16: Material aus eigener Herstellung

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blocking Puffer	1x TBST 5 % Magermilchpulver
Blottingpuffer (WB Transferpuffer)	100ml Towbin Puffer, 10x 200ml Ethanol reinst (vergällt) ad 1l Aqua demin
Laemmli Puffer (WB-Ladepuffer), 2 x	20 % Aqua demin 20 % Glycerin 12,5% Tris-HCl pH 6,8 4 % SDS 1 % Bromphenolblau 0,5 % β -Mercaptoethanol
LB (Luria Bertani)-Medium	0,01g Trypton 0,005g Hefeextrakt 0,01g NaCl in Aqua dest., autoklaviert
PBS	1,5 mM KH_2PO_4 0,8 mM Na_2HPO_4 137 mM NaCl 3 mM KCl pH 7,4
SDS-PAGE-Laufpuffer, 10 x	145g Glycin 30,3g Tris 10g SDS
TAE, 50 x	242g Tris pH 8,0 57,1ml Eisessig 100ml 0,5M EDTA
TBS, 10x	10mM Tris 150mM NaCl ad 1l mit Aqua demin auf pH 8,0 einstellen
TBST	1xTBS 0,1% Tween®-20
TLB	1% Triton 25 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl 1 Protease Inhibitor Tablette/10 ml
Towbin Puffer, 10x	30,3g Tris 145g Glycin ad 1l mit Aqua demin

Tabelle 17: erworbenes Material

Bezeichnung	Bezugsquelle
5-alpha Competent <i>E.coli</i> (High Efficiency)	New England Biolabs, Frankfurt
10-beta Competent <i>E.coli</i> (High Efficiency)	New England Biolabs, Frankfurt
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose, MP	AppliChem, Darmstadt
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Life Sciences, München
Amersham™ ECL™ Prime Western blotting reagent	GE Healthcare, Feiburg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt
Autoklavierbeutel	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Colorplus Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230kDa)	New England Biolabs, Frankfurt
cOMplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets	roche applied science, Mannheim
Deoxynucleotide Solution Mix	New England Biolabs, Frankfurt
DMEM („Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium“)	PAA Laboratoires GmbH, Cölbe
DMEM („Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium“)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Eisessig	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
fötales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Gel Red	Biotrend, Köln
Geneticin (G-418 Sulfate)	Gibco, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
High Pure RNA Kit	Roche Applied Science, Mannheim
Hoechst Stain 33258	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
L-Glutamin (200 mM)	PAA Laboratoires GmbH, Cölbe
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

Natriumphosphat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
NEA (non-essentiell aminoacids)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
NucleoBond Xtra Midi/Maxi Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren
PBS (ohne Ca ²⁺ und MG ²⁺)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Penizillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratoires GmbH, Cölbe
Pfx50 DNA Polymerase	Invitrogen, Darmstadt
PureYield Plasmid MiniPrep System	Promega, Mannheim
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Quick Blunting Kit	New England Biolabs, Frankfurt
Quick-Load® 1 kb DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt
Quick-Load® 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb)	New England Biolabs, Frankfurt
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
S.O.C. Medium	New England Biolabs, Frankfurt
SDS (Na-Dodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
T4 DNA Ligase	Roche Applied Science, Mannheim
Taq DNA Polymerase, recombinant	Invitrogen, Darmstadt
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethan-1,2-diamin)	Merck, Darmstadt
Tris	AppliChem, Darmstadt
TRITON® X-100 Detergenz	Merck, Darmstadt
TrueBlue Substrate	KPL, Gaithersburg MD, USA
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Trypton	Merck, Darmstadt
TrypZean Solution (1x)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tween®-20	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Verso 1-Step RT-PCR ReddyMix Kit	Thermo Scientific, Schwerte
Whatman® Blotting Paper	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Whatman® Protran® 0,2µm Nitrocellulose Membran	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Mannheim
X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent	roche applied science, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Tabelle 18: Primer, ihre Sequenz, Schmelztemperatur und Verwendung

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Tm (in °C; salt adjusted from oligo calc)	Verwendung
cdvH K-Primer forward	AAATCGGATCCACCATGCTCTCTACCAAGAC	53,8 (im Annealingbereich)	PCR zur Amplifikation von cdvH aus pCI-cdvH mit Schnittstelleninsertion
cdvH K-Primer reverse	GGTAGGTTTAAACTCAAGGTTTTGAACGATTACA	53,4 (im Annealingbereich)	
cdvF K-Primer forward	AAATCGCGGCCGCAAAAAATGATAAAATAAATT AGTTTTATTACTGATTGCGTTAGTTCTCTCTAAAA ATGCACAACAAAATCCCAA	52,3 (im Annealingbereich)	PCR zur Amplifikation von cdvH aus pCI-cdvF mit Schnittstelleninsertion und Einbringen des pE3L
cdvF K-Primer reverse	CTACCGTTTAAACTCAGAGTGATCTTACATATGA	53,4 (im Annealingbereich)	
HF_2nd	CTATTGCATCGGCAG	46	spezifische Insert-PCR cdvH
HR_2nd rc	GGGCTTTCATAATAATCC	49,3	
FF_2nd	CAGTCAACAGTACTTGG	52,4	spezifische Insert-PCR cdvF
FR_2nd rc	GGTATAGGGAGTTCTGG	52,4	
FH-Ins-Ctrl-F	CCAGATCCTTGAGACGG	54,9	spezifische Insert-PCR cdvFH (Übergangsbereich)
FH-Ins-Ctrl-R	GAGGAGACCAATCCACTG	56,3	
M PCR F	GGCCCCATTTTGCCACC	60,8	spezifische Insert-PCR cdvM
M PCR R	CCATGAGCGGGTAACACAG	59,5	
P567F	AAAATGAAACCCGGGGATCT	56,4	PCR Deletion III MVA (von den Doel)
P586R	GTCTGAGGAAAAGGTGTAGCGTAT	63,6	
MVA-Del3-F	GATGAGTGTAGATGCTGTTATTTTG	60,9	PCR Deletion III MVA (Lehmann)
MVA-Del3-R	AGCAGCTAAAAGAATAATGGAATTG	59,2	
PmH5 for	AAATACAAAGGTTCTTGAGGG	55,4	PCR I8R/G1L MVA
73 spec rev	GATGTGGTCATTAGAGTTTG	49,3	
PE3L	CTGATTGCGTTAGTTCTCTC	56,4	Primer für Sequenzierung, aber auch bei spez. Insert-PCR benutzt
F Seq R 1	CTGAATTTAATAATTTCTCATACTC	55,9	
F Seq F 2	TTGCAACTAATGGTTACTTAATATC	57,6	
F Seq R 2	GGTTTAAATGTCGGATCGAC	56,4	
H1F	CTACCAACAGACACTCAAGC	58,4	Primer für die Sequenzierung des H-Genes (nach Virusisolation), aber auch bei spez. Insert-PCR benutzt (H2-Primer)
H1R	CCTACTGAAGTAGTAGCTCC	58,4	
H2F	GCATCGGCAGCAAATCC	58,4	
H2R	CCATTCAGTATAACCGGACC	58,4	
H3F	GGGCGGTTGACATTACCTC	59,5	
H3R	CTAGCTTATTGGTTACAATTGGG	59,2	

Tabelle 19: Geräte

Bezeichnung	Firma
Brutschrank	Eppendorf, Hamburg
ChemiDoc MP System	BioRad, München
Fluoreszenz-Mikroskop Olympus CKX41	Olympus, Hamburg
HeraSafe, Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific, Schwerte
Invers-Mikroskop MBL3200	A. Krüss Optronik, Hamburg
Kipproller	Phoenix Instrument, Garbsen
Mastercycler pro	Eppendorf, Hamburg
MicroChem, DNR Bio-Imaging Systems	Biostep, Jahnsdorf
MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
Mini Trans-Blot Cell	BioRad, München
Mx3005P QPCR System	Agilent Technologies, Böblingen
NanoDrop 1000	Thermo Scientific, Schwerte
peqSTAR 2X Thermocycler	Peqlab, Erlangen
PowerPac Power Supply	BioRad, München
Sonopuls	Bandelin electronic, Berlin
ThermoMixer	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	Memmert, Schwabach

Tabelle 20: verwendete Software

Bezeichnung	Bezugsquelle	Verwendung
Lasergene Package	DNASar	<i>Alignments</i> , Sequenzanalysen
CLC workbench	http://www.clcbio.com/	<i>Alignments</i> , Sequenzanalysen
DNA Baser	Heracle BioSoft: http://www.dnabaser.com/download/download.html	Assemblies
MEGA5	http://www.megasoftware.net/	<i>Alignments</i> , phylogenetische Bäume
Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html	Primer legen & PCR-Design
Prism5	GraphPad Software	Grafiken
Sequence Scanner Software	http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/support/software-community/free-ab-software.html	Analyse von Sequenz(roh)daten
SMS2 (Sequence Manipulation Suite)	http://www.bioinformatics.org/sms2/index.html	<i>Alignments</i> , Sequenzanalysen, grouping, Translation...

Sequenzen dieser Arbeit (FASTA-Files)

>M MM Gen

```

ATGACTGAGG TGTACGACTT CGATCAGTCT TCTTGGGACA CCAAAGGCTC ATTGGCCCCC ATTTTGCCCA
CCACTTATCC CGATGGTAGG CTCATACCCC AAGTCAGAGT AATAGATCCA GGACTCGGCG ATCGGAAAAGA
TGAATGCTTC ATGTATATTT TCCTACTGGG TATAATAGAA GACAATGATG GCCTCGGACC CCCAATTGGA
AGAACATTTG GATCGCTGCC TTTAGGTGTT GGGCGTACTA CAGCCAGACC TGAGGAGTTA TTGAAAAGAAG
CCACCCTGTT GGATATTGTG GTAAGGCGAA CTGCAGGTGT CAAGGAACAA CTGGTATTTT ATAATAACAC
CCCATTGCAC ATCTTAACTC CGTGGAAGAA GGTCCCTTACG AGTGGAAGTG TGTTCAAGTGC AAATCAAGTC
TGTAACGCAG TCAATCTAAT ACCATTAGAC ATAGCACAAA GATTCAAGGT GGTATATATG AGCATCACTC
GACTATCAGA CGATGGAAGT TACAGAATTC CTCGCGGGAT GTTTGAATTC CGCTCCAGGA ATGCTTTAGC
ATTTAATATT TTAGTCACCA TTCAAGTTGA GGGAGATGTC TGTTCAAGCC GAGGTAATTT GAGCATGTTC
AAAGATCACC AAGTGACATT CATGGTGCAT ATCGGCAATT TCAGCCGTAA GAAGAACCAA GCTTACTCTG
CTGATTATTG TAAACTGAAA ATTGAAAAGA TGGGATTAGT GTTTGCTCTA GGAGGGATAG GAGGAACGAG
TCTTCACATA CGATGTACTG GTAAGATGAG CAAGGCCTTG AATGCCCAGC TAGGTTTCAA GAAAATCCTG
TGTTACCCGC TCATGGAGAT CAATGAAGAT TTGAATCGAT TTCTATGGAG ATTAGAGTGC AAAATAGTAA
GAATCCAAGC AGTCTTGCAA CCATCAGTCC CACAAGATTT CAGAGTTTAT AATGATGTTA TCATCAGCGA
TGATCAGGGT CTTTTCAAAA TTCTCTAA

```

>M MM Protein

```

MTEVYDFDQS SWDTKGS LAP ILPTTYPDGR LIPQVRVIDP GLGDRKDECF MYIFLLGIIE DNDGLGPPIG
RTFGSLPLGV GRTTARPEEL LKEATLLDIV VRRTAGVKEQ LVFYNNTP LH ILTPWKVLT SGSVFSANQV
CNAVNLIPLD IAQRFRVVYM SITRLSDDGS YRIPRGMFEF RSRNALAFNI LVTIQVEGDV CSSRGNLSMF
KDHQVTFMVH IGNFSRKKNQ AYSADYCKLK IEKMLGVFAL GGIGGTS LHI RCTGKMSKAL NAQLGFKKIL
CYPLMEINED LNRFLWRLEC KIVRIQAVLQ PSVPQDFRVY NDVIISDDQG LFKIL*

```

>F MM Gen

```

ATGCACAACA AAATCCCCAA AAGGTCCAAC ACCCGAAAAAC ACACCCAACA AGACCTCCCC CCACAACACA
GCACCAAATC CGCCGAGACC AAGACCTCCC AAGCACGACA CAGCACAACA TCGGCTCGGC GATCCACGCA
CCATGGTCCT CTAACATCGG ACAGGCCCAT CCACTACATC ATGAACAGGA TCAGGTCCCTG CAAGCAAGCC
AGCCACAGAT CGGATAACAT CCCGGCTCAC GGAGACCATG AGGGCACCAT CCATCACACA CCAGGGAGTG
TCTCCCAAGG AGCGGGATCC CGGCTCAAAA GGCGGCAATC CAATGCAACC AACTCAGGCT CTCAGTGCAC
CTGGTTAGTC CTATGGTGCA TTGGAATAGC CAGTCTCTTT CTTTGTTCTA AGGCTCAGAT ACATTGGAAT
AATTTGTCAA CTATTGGGAT TATCGGGACT GACAGTGTCC ATTATAAGAT CATGACTAGA CCCAGTCACC
AGTACTTGGT CATAAACTA ATGCCTAATG TTTCACTTAT AGATAATTGT ACCAAAGCAG AATTAGGTGA
GTATGAGAAA TTATTAAATT CAGTCCTCGA GCCAATCAAT CAAGCTTTGA CTCTAATGAC CAAGAATGTG
AAGCCCCTAC AGTCAGTAGG GTCAGGTAGG AGACAAAGGC GTTTTGCAGG AGTGGTGCTT GCAGGTGCAG
CTTTAGGAGT AGCCACAGCT GCACAAATCA CTGCAGGGAT AGCTTTACAT CAATCCAACC TCAATGCTCA
AGCAATCCAA TCTCTGAGAA CTAGCCTTGA ACAGTCCAAC AAGGCTATAG AAGAAATTAG GGAGGCAACC
CAGGAAACCG TCATTGCCGT TCAGGGAGTT CAGGATTACG TCAATAATGA ACTCGTCCCT GCTATGCAAC
ATATGTCGTG TGAATTAGTT GGGCAGAGAT TAGGGTTAAA ACTGCTTAGG TATTATACCG AGTTGTTGTC
AATATTTGGC CCGAGTTTAC GTGATCCTAT TTCAGCCGAG ATATCAATTC AAGCACTGAG TTATGCTCTT
GGGGGAGAAA TTCATAAGAT ACTTGAGAAG TTGGGATATT CTGGAAATGA TATGATTGCA ATTTTGAGAG
GTCGGGGGAT AAAACAAAA ATAACCCATG TTGATCTCCC CGGGAAACTC ATCATCTTAA GTATCTCATA
CCCAACTTTA TCAGAAGTCA AGGGGGTTAT AGTCCACAGA CTGGAAGCAG TTTCTTATAA TATAGGGTCA
CAGGAGTGGT ACACCACTGT CCCGAGGTAT GTTGCAACTA ATGGTTACTT AATATCTAAT TTTGATGAGT
CACCTGTGT ATTCTGTCTCA GAATCAGCCA TTTGTAGCCA GAACTCCCTA TACCCCATGA GCCCCTTCT
ACAACAATGC ATTAGGGGTG ACACTTCATC TTGTGCTCGG ACCTTGGTGT CTGGGACGAT GGGCAACAAG
TTTATTCTGT CAAAAGGTAA TATCGTCGCA AATTGTGCTT CTATACTGTG TAAGTGTTAT AGCACAGGCA
CAATTATCAA TCAGAGTCCT GATAAATTGC TGACATTTAT TGCTCCGAT ACCTGCCAC TGGTTGAGAT
AGATGGGTGA ACTATCCAGG TTGGAGGGAG GCAATACCTT GATATGGTAT ACGAAAGCAA AGTTGCCTTA
GGCCCTGCTA TACTCACTGA GAGGTTAGAT TAGGTACAA ATTTAGGGAA CGCCCTTAAG AAATGGATG
ATGCTAAGGT ACTGATAGAC TCCTCTAACC AGATCCTTGA GACGGTTAGG CGCTCTTCTT TTAATTTTGG
CAGTCTTCTC AGCGTTCCCA TATTAATATG TACAGCCCTG GCTTTGTTGT TGCTGATTTA CTGCTGTAAA
AGACGCTACC AACAGACACT CAAGCAGAAT GCTAAGGTCTG ATCCGACATT TAAACCTGAT TTGACTGGAA
CTTCGAAATC CTATGTAAGA TCACTCTAA

```

>F MM Protein

```

MHNKIPKRSN TRKHTQQDLP PQHSTKSAET KTSQARHSTT SARRSTHHGP LTSDRPIHYI MNRIRSCKQA
SHRSDNIPAH GDHEGTIHHT PGSVSQGAGS RLKRRQSNAT NSGSQCTWLW LWCIGIASLF LSCSKAQIHW
NLSTIGIIGT DSVHYKIMTR PSHQYLVIKL MPNVSLIDNC TKAELEGYEEK LLNSVLEPIN QALTLMTKNV
KPLQSVGSGR RQRRFAGVVL AGAALGVATA AQITAGIALH QSNLNAQAIQ SLRTSLEQSN KAIEEIREAT
QETVIAVQGV QDYVNNELVP AMQHMSCELV GQRLGLKLLR YYTELLSIFG PSLRDPISAE ISIQALSIAL
GGEIHKILEK LGYSGNDMIA ILESRGIKTK ITHVDLPGLK IILSISYPTL SEVKGIVIVHR LEAVSYNIGS
QEWYTTVSRY VATNGYLISN FDESPCVFVS ESAICSQNSL YPMSPLLQOC IRGDTSSCAR TLVSGTGMGNK
FILSKGNIVA NCASILCKCY STGTIINQSP DKLLTFIASG TCPLVEIDGV TIQVGGRQYP DMVYESKVAL
GPAISLERLD VGTNLGNALK KLDDAKVLID SSNQILETVR RSSFNFGSL LSVPIILICTAL ALLLLIYCCK
RRYQQTLLQN AKVDPTFKPD LTGTSKSYVR SL*

```

>H MM Gen

```

ATGCTCTCCT ACCAGGACAA GGTGAGTGCC TTCTATAAGG ATAATGCAAG AGCTAATTCA TCCAAGCTAT
CCTTAGTGAC AGAAGAGCAA GGGGGCAGGA GACCACCCTA TTTGCTGTTT GTCCTTCTCA TCCTACTGGT
TGGAATCATG GCCTTGCTTG CTATCACTGG AGTTCGATTT CACCAAGTAT CAACTAGCAA TATGGAATTT
AGCAGATTGC TGAAAGAGGA TATGGAGAAA TCAGAGGCCG TACATCACCA AGTCATAGAT GTCTTGACAC
CGCTCTTCAA AATTATTGGA GATGAGATTG GGTTACGGTT GCCACAAAAA CTAAACGAGA TCAAACAATT
TATCCTTCAA AAGACAACT TCTTCAATCC GAACAGGGAG TTCGACTTCC GCGATCTCCA CTGGTGCAAT
AACCCACCTA GTAAGATCAA AGTGAATTTT ACTAATTACT GCGATACAAT TGGGATCAGA AAATCTATTG
CATCGGCAGC AAATCCTATC CTTTTATCAG CACTCTCCGG AGGCAGAGGT GACATATTCC CACCATACAG
ATGCAGTGGA GCTACTACTT CAGTAGGCAG AGTTTTCCCC CTATCAGTAT CATTGTCCAT GTCTTTGATC
TCAAGAACAT CAGAGATAAT CAATATGCTA ACCGCTATCT CAGACGGAGT GTATGGTAAA ACTTATTTGC
TAGTTCCTGA TTATATTGAA GGGGGGTTTCG ACACGCAAAA GATTCGAGTC TTTGAGATAG GGTTCATCAA
ACGGTGGCTG AATGACATGC CATTACTCCA GACAACCAAC TATATGGTCC TCCCGGAGAA TTCCAAAGCC
AAGGTATGTA CTATAGCGGT GGGCGAGTTG ACACTGGCTT CCTTGTGTGT AGATGAGAGC ACCGTATTGT
TATATCATGA CAGCGATGGT TCACAAGATG GTATTCTAGT GGTGACGCTG GGAATATTTG GGGCAACACC
TATGGATCAA GTTGAAGAGG TGATACCTGT TGCTCACCCA TCAGTAGAAA AAATACATAT AACAAATCAC
CGTGGGTTC TAAAGATTTC AATAGCAACC TGGATGGTGC CTGCATTGGT ATCTGAGAAA CAAGAGGAAC
AAAAAAATTG TCTGGAGTCG GCTTGTCAAA GAAAATCCTA CCCTATGTGC AACCAAACGT CATGGGAACC
CTTTGGAGGA GGACAGTTGC CATCTTATGG GCGGTTGACA TTACCTCTAG ATCCAAGCAT TGACCTTCAA
CTTAACATCT CGTTTACATA CGGTCCGGCT ATACTGAATG GAGACGGTAT GGATTATTAT GAAAGCCAC
TTTTGGACTC CGGATGGCTT ACCATTCCCC CCAAGAACGG AACAGTCCTT GGATTGATAA ACAAAGCAAG
TAGAGGAGAC CAATCCACTG TAATCCCCCA TGTGTTGACA TTTGCGCCCA GGAATCAAG TGGAATTTGT
TATTTACCTA TTCAAACATC CCAGATTATG GATAAAGATG TCCTTACTGA GTCCAATTTA GTGGTGTGTC
CTACACAGAA TTTTAGATAT GTCATAGCAA CATATGATAT ATCCCGGGGC GATCATGCGA TTGTTTATTA
TGTTTATGAC CCAATCCGGG CGATTTCTTA TACGTACCCA TTTAGACTAA CTACCAAGGG TAGACCTGAT
TTCCTAAGGA TTGAATGTTT TGTGTGGGAT GACGATTTGT GGTGTCACCA ATTTTACCGA TTCGAGGCTG
ACAGACCAA CTCTACAACC AGTGTTGAGA ATTTAGTCCG TATAAGATTC TCATGTAATC GTTCAAAACC
TTGA

```

>H MM Protein

```

MLSYQDKVSA FYKDNARANS SKLSLVTEEQ GRRPPYLLF VLLILLVGIM ALLAITGVRF HQVSTSNMEF
SRLLKEDMEK SEAVHHQVID VLTPLFKIIG DEIGLRPLQK LNEIKQFILQ KTNFFNPNRE FDFRDLHWCI
NPPSKIKNVF TNYCDTIGIR KSIASANPI LLSALSGRG DIFPPYRCSG ATTSVGRVFP LSVSLSMSLI
SRTSEIINML TAISDGVYK TYLLVPDYIE GGFDTQKIRV FEIGFIKRWL NDMPLLQTTN YMVLPENSKA
KVCTIAVGEL TLASLCVDES TVLLYHDSG SQDGILVVTI GIFGATPMDQ VEEVIPVAHP SVEKIHITNH
RGFIKDSIAT WMVPALVSEK QEEQKNCLES ACQRKSYPMC NQTSWEPFGG GQLPSYGRIT LPLDPSIDLQ
LNISFTYGPA ILNGDGMDDY ESPLLDGWL TIPPKNGTVL GLINKASRGD QSTVIPHVL TAPRESSGNC
YLPQTSQIM DKDVLTESNL VVLPTQNFYR VIATYDISRG DHAIVYVYD PIRAI SYTYP FRLTTKGRPD
FLRIECFVWD DDLWCHQFYR FEADSTNSTT SVENLVIRIF SCNRSKP*

```

>S15 H Gen

```

ATGCTCTCCT ACCAAGACAA GGTGGGTGCC TTCTATAAGG ATAATGCAAG AGCCAATTCA TCCAAGCTGT
CCTTAGTGAC AGAAGAGCAT GGGAGCAGGA GACCACCCTA TTTGCTGTTT ATCCTTCTCA TCCTACTGGT
TGGAATCATG GCCTTGCTTG CTATCACTGG AGCTCGATTT CACCAAATAT CAACTAGCAA TATGGAATTT
AGCAGATTGC TGAAAGAGGA TATGGAGAAA TCAGAGGCCG TACATCACCA AGTCATAGAT GTCTTGACAC
CGCTCTTCAA AATTATTGGA GATGAGATTG GGTTACGGTT GCCACAAAAA CTGAACGAGA TCAAACAGTT

```

TATCCTTCAA	AAGACAAACT	TCTTCAATCC	GCAAAGGGAA	TTGACTTCC	GCGACCTCCA	CTGGTGCATT
AACCCACCTA	GTAAGATCAA	GGTGAATTTT	ACTAATTACT	GCGATACAAT	TGGGATCAGA	AAATCTATTG
CATCGGCAGC	AAATCCCATC	CTTTTGTCCG	CACTCTCCGG	AGGCAGGGGT	GACATATCCC	ACCAGCACAG
ATGTAGTGGA	GCTACTACTT	CAGTAGGCAG	AGTTTTCTCC	CTCTCAGTAT	CATTGTCCAT	GTCTTTGATC
TCAAGAACAT	CAGAGATAAT	CAATATGCTA	ACCGCTATCT	CAGACGGAGT	GTATGGTAAA	ACTTACTTGC
TAGTGCCTGA	TTATATTGAA	GGGGAATTCC	ACATGCAAAA	AATTCGAGTC	TTTGAGATAG	GGTTCATCAA
ACGGTGGCTG	AATGACATGC	CATTACTCCA	GACAACCAAC	TATATGGTCC	TCCCGGTGAA	CTCCAAAGCC
AAGGTATGTA	CTATAGCAGT	GGGCGAGTTG	ACACTGGCTT	CCTTGTGTGT	AGATGAGAGC	ACTGTATTAT
TATATCATGA	CAGCAATGGT	TCACAAGATG	GTATTCTAGT	AGTGACGCTG	GGAATATTGT	GGGCAACACC
TATGGATCAA	GTTGAAGAGG	TGATACCTGT	CGCTCACCCA	TCAGTGGAAA	AAATACATAT	AACAAATCAC
CGTGGGTTCA	TAAAAGATTG	AATAGCAACC	TGGATGGTGC	CTGTATTAGT	CTCTGAGAAA	CAAGAGGAAC
AGAAAAATTG	TCTGGAGTCG	GCTTGCCAAA	GAAAATCCTA	CCCTATGTGC	AACCAAACGT	CATGGGAACC
CTTTGGTGGA	GGACATTTGC	CATCTTATGG	GCGGTTGACA	TTACCTCTAG	ATCCAGGCAT	TGACCTTCAA
CTTAATATAT	CGTTTACACA	CGGTCCGATT	ATACTGAATG	GAGATGGTAT	GGATTATTAT	GAAAAGCCAC
TTTTGGACTC	CGGGTGGCTT	ACCATTCTCT	CCAAGAACGG	GACAGTTCTT	GGATTGATAA	ACAAAGCAAG
TAGAGGAGAC	CAGTTCCTG	TAACCCCCCA	TGTGTTGACA	TTTGCGCCTA	GGGAATCAAG	TGGGAATTGT
TATTTACCTA	TCCAAACATC	TCAGGTTATG	GATAAAGATG	TCCTTACTGA	GTCCAATTTG	GTGGTGTTCG
CTACACAGAA	TTTTAGATAT	GTCATAGCAA	CATATGATGT	ATCCCGGGAT	GATCATGCGA	TTGTTTATTA
TGTTTATGAC	CCAATCCGGA	CGATTTCTTA	TACGTACCCA	TTTAGACTAA	CTACCAAGGG	TAGACCTGAT
TTCCTAAGGA	TTGAATGTTT	TGTGTGGGAT	TACGATTTGT	GGTGTACCCA	ATTTTACCGA	TTCGAGGCTG
ACATCACCAA	CTCTACAACC	AGTGTGAGA	ATTTAGTCCG	TATAAGGTTT	TCATGTAACC	GTTCAAAACC
TTGA						

>S15 H Protein

MLSYQDKVGA	FYKDNARANS	SKLSLVTEEH	GSRRPPYLLF	ILLILLVGIM	ALLAITGARF	HQISTSNMEF
SRLLKEDMEK	SEAVHHQVID	VLTPLFKIIG	DEIGLRPLQK	LNEIKQFILQ	KTNFFNPQRE	FDFRDLHWCI
NPPSKIKNVF	TNYCDTIGIR	KSIASAAPI	LLSALSGGRG	DISHQHRCSG	ATTSVGRVFS	LSVSLSMSLI
SRTSEIINML	TAISDGVYK	TYLLVPDYIE	GEFDMQKIRV	FEIGFIKRWL	NDMPLLQTTN	YMLVPVNSKA
KVCTIAVGEL	TLASLCVDES	TVLLYHDSNG	SQDGILVVTL	GIFGATPMDQ	VEEVIPVAHP	SVEKIHITNH
RGFIKDSIAT	WMVPVLVSEK	QEEQKNCLES	ACQRKSYPMC	NQTSWEPFGG	GHLPSYGRLT	LPLDPGIDLQ
LNISFTHGPI	ILNGDGMDDY	ESPLLDGWL	TIPPKNGTVL	GLINKASRGD	QFTVTPHVL	FAPRESSGNC
YLPQTSQVM	DKDVLTESNL	VVLPTQNFYR	VIATYDVSRD	DHAIVYVYD	PIRTISYTP	FRLTTKGRPD
FLRIECFVWD	YDLWCHQFYR	FEADITNSTT	SVENLVRIRF	SCNRSKP*		

>S15 F Gen

ATGCACGACA	AAATCTCCAA	CAGATCCAAA	ACCCGAACAC	ACACCCAACA	AGACCTCCCC	CAACAACACA
ACACCAAATC	CGCCGAGACC	AAGACCTCCC	AAGCACGACA	CAGCATAACA	TCGGTTCAGC	TATTCACGCA
CCATGGTCCT	CGAACATCGG	ACAGGCCCTT	TCACTACATC	ATGGACAGAG	CTAGGTCTTG	CAAGCAAGTC
AGCTACAGAT	CGGATAACAT	CCCGGCTCAC	GGAGACCACG	AGGGTATTAT	CCATCACATA	CCAGAGAGTT
TCACCCGAGG	AGGGAGACCC	CGGTTCAAAA	GGCAGCAATC	CAACGCAACC	AACTCAGGCT	TTCAGTGCAC
CTGGTTAGTC	CTGTGGTACA	TCGGAATAGC	TAATCTCTTT	CTTTGTTCTA	AGGCTCAGAT	ACATTGGAAT
AATTTGTCAA	CTATTGGGAT	TATCGGGACT	GACAGTGTCC	ATTATAAGAT	CATGACTAGA	CCCAGTCATC
AGTACTTGGT	CATAAACTA	ATGCCCAATG	TTTCACTTAT	AGATAATTGT	ACCAAAGCAG	AATTAGGTGA
GTATGAGAAA	TTATTAAATT	CAGTCCTCGA	GCCTATCAAC	CAAGCTTTGA	CTCTAATGAC	CAAGAATGTG
AAACCCCTAC	AGTCAGTAGG	GTCAGGCAGG	AGACAGAGGC	GTTTTGCGGG	AGTGGTGCTT	GCAGGTGCAG
CTTTGGGAGT	GGCCACGGCT	GCACAGATCA	CTGCAGGGAT	AGCTTTTACAT	CAATCCAACC	TCAATGCTCA
AGCAATCCAA	TCTCTGAGAG	CTAGCCTTGA	ACAGTCCAAC	AAGGCTATAG	AAGAAAATTAG	GGAGGCAACC
CAGGAAACCG	TCATTGCTGT	TCAGGGAGTC	CAGGACTACG	TAAATAATGA	ACTCGTTCCC	GCTATGCAAC
ATATGTCGTG	TGAATTAGTC	GGGCAGAGGT	TAGGGTTAAA	ACTTCTTAGG	TATTACACCG	AATTGTTGTC
AATATTTGGC	CCGAGCTTAC	GTGACCCTAT	TTCAGCCGAG	ATATCAATTC	AAGCACTGAG	TTATGCCCTT
GGGGGAGAAA	TTCATAAGAT	ACTTGAGAAG	TTGGGATATT	CTGGAAATGA	TATGATTGCA	ATTTTGGAGA
GTCGGGGGAT	AAAGACAAAA	ATAACTCATG	TTGATATCCC	CGGAAAACCTC	ATCATCTTAA	GTATCTCATA
CCCAACTCTA	TCAGAAGTTA	AGGGGGTTAT	AGTCCACAGA	CTGGAAGCAG	TTTCTTATAA	CATAGGGTCA
CAGGAGTGGT	ACACTACTGT	CCCGAGGTAT	GTTGCAACTA	ATGGTTACTT	AATATCTAAT	TTTGATGAGT
CATCCTGTGT	ATTCGTCTCA	GACTCAGCCA	TTTGACAGCCA	AAACTCTCTT	TACCCCATGA	GCCCCGCTTCT
ACAACAGTGC	ATTAGGGGCG	ACACTTCATC	CTGTGCTCGA	ACCTTGGTGT	CTGGGACTAT	GGGCAACAAG
TTTATACTGT	CAAAAGGTAA	TATCGTCGCA	AATTGTGCTT	CTATATTATG	TAAGTGTTAT	AGCACAAGCA

CAATTATCAA	TCAGAGTCCT	GATAAGTTAC	TGACTTTTAT	TGCCTCCGAC	ACCTGCCCCAC	TGGTTGAAAT
AGATGGTGTA	ACTATCCAGG	TTGGGGGGGAG	GCAATATCCT	GATATGGTAT	ACGAAAGCAA	AGTTGCTTTA
GGCCCTGCTA	TATCACTTGA	GAGGTTAGAT	GTGGGTACAA	ATTTAGGGAA	CGCCCTTAAG	AAACTGGATG
ATGCTAAGAT	ACTGATAGAC	TCCTCAAACC	AGATCCTTGA	GACGGTTAGG	CGCTCTTCCT	TTAATTTTGG
TAGTCTCCTC	AGCGTTCCCA	TATTAATCTG	TACTGCCCTG	GCTTTGTTGT	TGCTGATTTA	CTGCTGTAGA
AGACGCTACC	AACAGACACT	CAATCAGAAG	ACTAAGGTCG	ATCCGACATT	TAAACCTGAT	TTGACTGGAA
CTTCGAAATC	CTATGTAAGA	TCACTCTGA				

>S15 F Protein

MHDKISNRSK	TRTHTQQDLP	QQHNTKSAET	KTSQARHSIT	SVQLFTHHGP	RTSDRPFHYI	MDRARSCKQV
SYRSDNIPAH	GDHEGIIHHI	PESFTRGGRP	RFKRQQSNAT	NSGFQCTWL	LWYIGIANLF	LCSKAQIHW
NLSTIGIIGT	DSVHYKIMTR	PSHQYLVIKL	MPNVSLIDNC	TKAELGEYEK	LLNSVLEPIN	QALTLMTKNV
KPLQSVGSGR	RQRRFAGVVL	AGAALGVATA	AQITAGIALH	QSNLNAQAIQ	SLRASLEQSN	KAIEEIREAT
QETVIAVQGV	QDYVNNELVP	AMQHMSCELV	GQRLGLKLLR	YYTELLSIFG	PSLRDPISAE	ISIQALSVAL
GGEIHKILEK	LGYSGNMIA	ILESRIKTK	ITHVDIPGKL	IILSISYPTL	SEVKGIVVHR	LEAVSYNIGS
QEWYTTVPRY	VATNGYLISN	FDESSCVFVS	DSAICSQNSL	YPMSPLLQQC	IRGDTSSCAR	TLVSGTMGNK
FILSKGNIVA	NCASILCKCY	STSTIINQSP	DKLLTFIASD	TCPLVEIDGV	TIQVGGRQYP	DMVYESKVAL
GPAISLERLD	VGTNLGNALK	KLDDAKILID	SSNQILETVR	RSSFNFGSL	SVPIILICTAL	ALLLLIYCCR
RRYQQTLNQK	TKVDPTFKPD	LTGTSKSYVR	SL*			

X. DANKSAGUNG

Ich möchte hiermit all denen ganz herzlich danken, die mich tatkräftig, finanziell und moralisch unterstützt und damit den Abschluss dieser Arbeit ermöglicht haben.